CITRATSEKRETION IN DAS DUODENUM BEI NORMALPERSONEN UND PATIENTEN MIT CHRONISCH CALCIFIZIERENDER PANKREATITIS

Heinrich Hümmer

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546806_0003

Aus der V. Medizinischen Abteilung
des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing
Chefarzt: Prof. Dr. H. Kaess

CITRATSEKRETION IN DAS DUODENUM BEI NORMALPERSONEN UND PATIENTEN MIT CHRONISCH CALCIFIZIERENDER PANKREATITIS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Heinrich Hümmer
aus
Lindau/Bodensee

Jahr
1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der

Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H.Kaess
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N.Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.81

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern für die jahrelange
verständnisvolle Unterstützung

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung Seite

1.1 Pathologie der chron. calcifiz. Pankreatitis

1.1.1 Anatomie und Histologie..... 1

1.1.2 Pathogenese..... 2

1.1.3 Ätiologie..... 3

1.2 Bisherige Arbeiten zur Problematik der Pankreasverkalkung 3

1.2.1 Chemie der Pankreassteine..... 3

1.2.2 Steinauflösung in vitro durch Citrat..... 4

1.2.3 Citratsekretion bei normalen Hunden..... 5

1.2.4 Einfluß von chronischen Alkoholgaben auf die Citratsekretion beim Hund..... 6

1.2.5 Bisherige Messungen am Menschen..... 7

1.3 Problemstellung..... 7

2 Methoden

2.1 Versuchsaufbau..... 8

2.1.1 Sekretintest..... 8

2.1.2 Dosis-Wirkungskurven unter Cerulein-Stimulation..... 9

2.1.3 Messung von Citrat im Gallensaft..... 10

2.1.4 Messung der Serumcitrat-Konzentration..... 11

2.2 Messung der zu untersuchenden Parameter..... 11

2.2.1 Citrat..... 11

2.2.2 HCO_3^-, Cl^- und exokrine Enzyme..... 15

2.3 Patientenkollektiv..... 16

2.3.1 Serumcitrat..... 16

2.3.2 Citrat im Sekretintest..... 17

2.3.3 Dosis-Wirkungskurven unter Cerulein-Stimulation..... 18

Seite

2.4 Testverfahren 18

3 Ergebnisse

3.1 Citratkonzentration im Serum 19

3.2 Citratkonzentration in der Galle 19

3.3 Meßergebnisse im Duodenalsaft 21
3.3.1 Sekretintest 21
3.3.1.1 Volumensekretion 21
3.3.1.2 Bicarbonat- und Chloridsekretion 22
3.3.1.3 Proteinsekretion 24
3.3.1.4 Citratsekretion 24
3.3.1.5 Korrelationen der Sekretionsmengen von Citrat und Enzymproteinen 30
3.3.2 Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei Cerulein-Stimulation 33
3.3.2.1 Sekretionsmuster von Citrat 33
3.3.2.2 Sekretionsmuster von Bicarbonat und Enzym-Proteinen 33
3.3.2.3 Korrelation Citrat-Bicarbonat Citrat-Proteine 33
3.3.2.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung von Citrat 46

4 Diskussion 50

5 Zusammenfassung 53

Literaturverzeichnis 54

1 Einleitung

1.1 Pathologie der chronisch calcifizierenden Pankreatitis (CCP)

1.1.1 Anatomie und Histologie

Anläßlich eines Symposiums über Pankreatitis in Marseille 1963 wurde die chronische Pankreatitis in folgender Weise definiert:

> " Die chronische Pankreatitis, die auch als chronisch rezidivierende Pankreatitis bezeichnet werden kann, wenn im klinischen Verlauf akute Exazerbationen im Vordergrund stehen, ist entweder durch anatomische oder funktionelle Restschäden des Pankreas gezeichnet, die selbst nach der Elimination der primären Ursachen oder Krankheitsfaktoren fortbestehen." (38)

Damit ist ihr Verlauf im Gegensatz zur akuten Pankreatitis, welche durchaus zu einer restitutio ad integrum kommen kann, gekennzeichnet.
Histologisch fällt die lobuläre, herdförmige Topographie der Läsionen auf; geschädigte Läppchen sind von normalen umgeben, wobei alle Läppchenelemente betroffen sind. Die Azinuszellen verändern sich im Sinne einer Homogenisierung des Zytoplasmas und dem Verschwinden der Zymogengranula. Schließlich resultiert als Endstadium die Atrophie (31), (37).

Durch produktive Zellreaktion kommt es zu einer Sklerose zunächst perilobulärer Anteile und darauffolgend intralobulärer Anteile des exokrinen Pankreasgewebes.
Das endokrine Pankreas ist meist nicht geschädigt und bietet das Bild einer insulären Regression (15).

Von einem bestimmten Stadium der chronischen Pankreatitis ab lassen sich fast immer feine Niederschläge (eines Eiweißmaterials) in den Ganglumina nachweisen.
In diesen Fällen und in den Fällen, in denen sich (radiologisch) in der Abdomenübersichtsaufnahme Verkalkungen im Pankreas zeigen, spricht man von einer chronisch-calcificierenden Pankreatitis (CCP).

Pankreasverkalkungen werden beim Menschen (28) und ebenso beim Rind (45) beobachtet.

1.1.2 Pathogenese

Der pathophysiologische Mechanismus, der zunächst zur Verlegung der Ausführungsgänge durch einen Eiweißniederschlag und im weiteren Verlauf zur Bildung von Calciumsteinen führt, ist bisher noch ungeklärt und umstritten.

Diskutiert werden

- Zusammenhänge zwischen Konzentrierung und Fällung der Eiweiße (1)
- Eiweißpräzipitation auf Grund einer Aktivierung von Chymotrypsinogen (18)
- Einfluß eines erst kürzlich in Pankreassteinen gefundenen Proteins (MG 13.500) (10). Auf der anderen Seite ist von Lactoferrin (welches im Pankreassaft von CCP-Patienten in erhöhter Konzentration gefunden wird (4), (14) bekannt, daß es mit anderen Makromolekülen Komplexe bildet (17), die dann präzipitieren könnten.
- Einfluß eines erhöhten Spiegels von totalem Ca^{++} (16), der beim Oberschreiten des Löslichkeitsproduktes zur Ausfällung von $CaCO_3$ führt.

1.1.3 Ätiologie

Als Ursache für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis ist vor allem übermäßiger Alkoholgenuß in Verbindung mit eiweiß- und fettreicher Nahrung zu nennen (40). Die Grenze, ab der eine toxische Wirkung des Alkohols anzunehmen ist, scheint bei Männern bei 20 - 40 ml reinen Alkohols pro Tag und etwa der Hälfte bei Frauen zu liegen (39). Alkoholiker mit Pankreatitis nehmen signifikant mehr Eiweiß und Fett zu sich als die übrige Bevölkerung. Vom Beginn des Alkoholabusus bis zum Auftreten der ersten Pankreatitis-Symptome vergehen durchschnittlich 18 Jahre (36).
Idiopathische Formen der CCP machen etwa 20 - 30 % der Fälle aus. Außerdem ist noch die eiweißmangelinduzierte CCP (Morbus Kwashiorkor) zu erwähnen. Bei Korrelation mit anderen Krankheiten fand sich in 87 % von CCP gleichzeitig eine Störung des Kohlenhydrat- Stoffwechsels (29), (41).
Bei annähernd einem Viertel der Patienten mit Hyperparathyreoidismus konnte eine CCP gefunden werden (5).
Diese Tatsache weist auf die Wirkung eines erhöhten Ca^{++}-Spiegels als mögliche Entstehungsursache einer CCP hin.

1.2 Bisherige Arbeiten zur Problematik der Pankreasverkalkung

1.2.1 Chemie der Pankreassteine

Die in der Abdomenleeraufnahme sichtbaren Verkalkungen stellen sich entweder als feine, unregelmäßige, strahlenförmige oder linear angeordnete Verschattungen dar. In anderen Fällen sind größere, rundliche Schatten zu erkennen (33).

Die Steine setzen sich im wesentlichen (95 %) aus Calciumcarbonat $CaCO_3$, geringen Teilen von Oxalat und Phosphat und im Zentrum organischen Stoffen wie Eisen- und Mangansalzen zusammen (32). Außerdem wird in allen Steinschichten ein niedermolekulares Protein gefunden, das sowohl im normalen als auch im pathologischen Pankreassaft enthalten ist (10).
Ausgehend von der Theorie, nach der die Präzipitation von $CaCO_3$ aus dem damit übersättigten Pankreassaft hervorgerufen wird (12)(13), haben MOORE und VERINE (46) (27) (26) den Versuch zu einem Verständnis der physikochemischen Voraussetzungen des Niederschlags unternommen. Sie untersuchten das Löslichkeitsprodukt von $CaCO_3$ und erstellten ein thermodynamisches Modell für den Zustand von Ca^{++} im Pankreassaft.

1.2.2 Steinauflösung in vitro durch Citrat

In zwei Fallstudien (44), (2) wurde über die spontane Auflösung von Pankreasverkalkungen berichtet (im einen Fall bei gleichzeitiger Entstehung eines Pankreascarcinoms). Da offenbar eine Auflösung in vivo möglich ist, war von Interesse, inwieweit sich die Löslichkeit von $CaCO_3$ -Steinen (zunächst in vitro) erhöhen läßt.
Als geeignetes Lösungsmittel erwies sich dabei Citrat, weil es mit Ca- Ionen Chelatkomplexe bildet und zu Ca^{++} eine deutlich höhere Affinität besitzt als CO_3^{2-} .

($pk_{Citrat} = 3{,}15$, $pk_{CO_3^{2-}} = 0{,}82$) (46), (24)

Lohse et al. (24) kamen bei der Auflösung von menschlichen Pankreassteinen zu folgenden Ergebnissen:

a) Citratperfusion führt zu einer beschleunigten Auflösung menschlicher Pankreassteine.

b) Bikarbonat allein hemmt den Auflösungsprozeß signifikant um etwa 95%.

c) Bei Anwesenheit von HCO_3^- (entsprechend der Konzentration im Pankreassaft) und Citrat hat HCO_3^- nur noch einen geringen hemmenden Einfluß

d) Im Vergleich zu Citrat hat Albumin bei der Auflösung von Pankreassteinen nur einen sehr geringen Effekt.

50 mg menschliche Pankreassteine konnten mit Citrat in vitro innerhalb von 25 Tagen vollständig aufgelöst werden. Deswegen wurde untersucht, ob - und wenn ja - auf welche Weise Citrat aus dem Pankreas sezerniert wird.

1.2.3 Citratsekretion bei normalen Hunden

In einer zweiten Arbeit (23) untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe die Citratsekretion aus dem exokrinen Pankreas von Hunden und fand eine basale Citratsekretionsmenge von 0,11µmol/15 min bei Konzentrationen von 86 bis 312 µmol/l . Sekretingabe führte initial zu einer starken Citratkonzentrations-Abnahme (washing-out Phänomen).
Die anschließende Cerulein-Bolus-Injektion (25 ng/kg) führte zu einem kurzzeitigen signifikanten Anstieg der Sekretionsmenge von Citrat auf mehr als das Doppelte.
Ebenso verhielt sich die Proteinsekretionsmenge.

Ein zweiter Bolus (100 ng/kg) ließ die Citratsekretionsmenge auf das Siebenfache und die Proteinsekretion ebenfalls signifikant ansteigen.
Es bestand eine lineare Beziehung zwischen Citrat- und Proteinsekretion, die sich beim Vergleich der Citrat- und Bicarbonatsekretion nicht nachweisen ließ.

1.2.4 Einfluß von chronischen Alkoholgaben auf die Citratsekretion beim Hund

Da die Anamnese bei CCP- Patienten fast immer einen chronischen Alkoholismus ergibt, wurde der Einfluß von chronischer Äthanolgabe (2 g/kg/die über einen Zeitraum von 2 Jahren) auf die Pankreasfunktion beim Hund untersucht (42), (22).
Nach Ceruleingabe war sowohl das Sekretionsvolumen als auch die HCO_3^- - Sekretion bei chronisch alkoholischen Hunden erhöht.
Wie mit der Dosis-Wirkungskurve gezeigt werden konnte, führte die Stimulation mit steigenden Dosen Cerulein bei chronisch alkoholischen Hunden zu einer signifikant erniedrigten Citratkonzentration und Citrat-Sekretionsmenge. Auch die Protein-Konzentration war signifikant erniedrigt.
Die bei maximaler Cerulein-Stimulation theoretisch erreichbare maximale Citratsekretion (v_{max}) lag bei normalen Hunden etwa doppelt so hoch (913 nmol/15 min) wie bei chronisch alkoholischen Hunden (470 nmol/15 min). Zur Erzielung einer halbmaximalen Sekretion war jedoch bei normalen Hunden eine doppelt so hohe Cerulein-Dosis (D_{50}) erforderlich.
In beiden Kollektiven ergab sich eine lineare Beziehung zwischen Citrat- und Protein-Konzentration.

Es wird vermutet, daß sich parallel zu einer exokrinen Insuffizienz eine Citrat-Sekretions-Insuffizienz entwickelt.

1.2.5 Bisherige Messungen am Menschen

In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch beim Menschen Citrat zusammen mit enzymatischen Proteinen nach CCK-Bolus-Injektion aus dem Pankreas sezerniert werden (19). Auch hier besteht eine lineare Beziehung zwischen Protein- und Citratsekretion.

A.SALI et al. wiesen nach, daß orale Citratgaben die biläre Citrat-Sekretion erhöhen können (35).

1.3 Problemstellung

In dieser Arbeit soll die Citrat-Sekretion in das Duodenum bei Patienten mit CCP im Vergleich zu Normalpersonen untersucht und die Citrat- Protein- Korrelation bei CCP- Patienten und Normalpersonen berechnet werden.
Eine verminderte Citratsekretion bei chronisch calcifizierender Pankreatitis wäre dann als ein weiterer pathogenetischer Faktor zu diskutieren, der möglicherweise an der Entstehung von Pankreascalzifikationen beteiligt ist.

2 Methoden

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 Sekretintest

Um die exokrine Pankreasfunktion von Patienten mit chronisch calcifizierender Pankreatitis (CCP) mit der von Normalpersonen vergleichen zu können, wurde der Sekretintest durchgeführt.

Die 12 h nüchterne Versuchsperson schluckt unter Bildwandlerkontrolle die doppelläufige Sonde. Hat der Schlauch das Duodenum erreicht, so beginnt klare Galle zu fließen. Ob tatsächlich Galle gewonnen wurde, kann durch die pH-Messung (basisch!) überprüft werden. Durch den zweiten Schlauch, der im Magen verweilt, wird Magensaft abgesaugt. So kann eine Verunreinigung des Duodenalsaftes verhindert werden.

Anschließend wird das Pankreas mit je 1 Einheit Sekretin Karolinska/kg Körpergewicht und 1 Einheit Cholecytokinin (CCK) /kg Körpergewicht stimuliert. Das in 20 ml 0,9 % NaCl gelöste Gemisch wird mit Hilfe einer Perfusor-Pumpe intravenös infundiert, die 0,5 ml/min eingibt. Die Infusion läuft genau eine Stunde. Während dieser Zeit werden drei 20-minütige Fraktionen abgenommen.

Die Pankreas-Sekretions-Parameter Volumen, Bicarbonat, Citrat, Chlorid, Amylase, Lipase, Trypsin und Chymotrypsin wurden im Duodenalsaft gemessen, der in drei 20-minütigen Fraktionen abgenommen und gesammelt worden war.
Aus den Konzentrationen konnte dann die Sekretionsmenge als $\frac{\text{Konz.} \times \text{Vol.}}{\text{KG kg}}$ errechnet werden.

2.1.2 Dosis- Wirkungs- Kurven unter Cerulein-Stimulation

Über einen Zeitraum von 90 min wurde das Pankreas konstant mit 0,25 Einheiten Sekretin /kg KG/h i.v. stimuliert (Basisstimulation). Zusätzlich wurde ab der 20. Minute die Dosis mit 2 Einheiten Cerulein/kg KG/h stimuliert und nach jeweils 10 Minuten die Dosis um 1 Einheit Cerulein/kg KG/h erhöht, bis zu einer maximalen Stimulationsdosis mit 8 Einheiten Cerulein/kg KG/h von der 80. bis zur 90. Minute (Abb. 1)

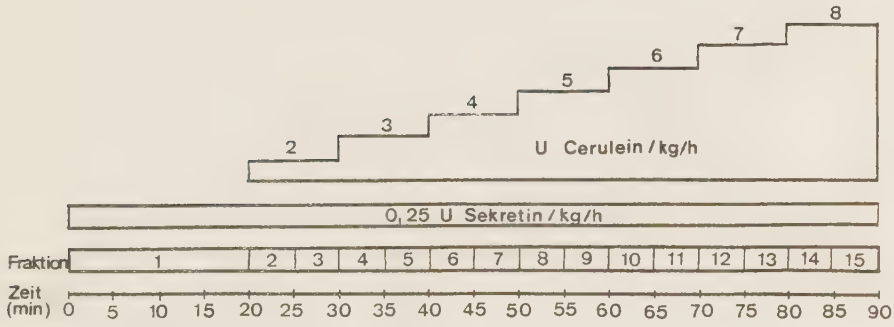


Abb. 1 Schema des Versuchsaufbaus (Stimulationsdosis und Fraktionsabnahme) im Dosis-Wirkungs-Versuch

Die erste Duodenalsaft-Sammelfraktion wurde nach 20 Minuten abgenommen, die 2. bis 15. in weiteren Abständen von je 5 Minuten.

Citrat- und Enzymkonzentrationen wurden in den Sammelproben 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 gemessen.
Konzentrationen und Sekretionsmengen der bereits genannten Parameter wurden gemessen (s.S.8).

2.1.3 Messung von Citrat im Gallensaft

Wegen der Galle- Beimengung zum Duodenalsaft war die Messung des Citratgehalts der reinen Galle erforderlich. Sie setzt sich aus Lebergalle und Blasengalle zusammen.
In Abhängigkeit von der Konzentration der Gallenblase verändert sich also die Konzentration des Gallensaftes.
Um die Schwierigkeiten, wie sie sich bei der Sondierung des Ductus choledochus ergeben, zu vermeiden, wurde Citrat getrennt im Ductus- hepaticus- Sekret und in reiner Blasengalle bestimmt.
Die reine Lebergalle ließ sich bei cystektomierten Patienten aus dem T- Drain abziehen, der üblicherweise intraoperativ gelegt wird. Blasengalle wurde intraoperativ bei cystektomierten Patienten direkt aus der Gallenblase gewonnen. Nur wenn die Gallenblase infolge Cholelithiasis entfernt werden mußte und sich kein Anhalt für eine Zirrhose oder Degeneration ergab, wurde die enthaltene Galle zur Citratbestimmung herangezogen.
Auf diese Weise war es möglich, die minimale und maximale Citrat- Konzentration im Ductus- choledochus-Sekret zu bestimmen.

2.1.4 Messung der Serum-Citratkonzentration

Getrennt nach den Kollektiven Normalpersonen, Alkoholiker und CCP-Patienten wurde die Serum-Citratkonzentration gemessen.

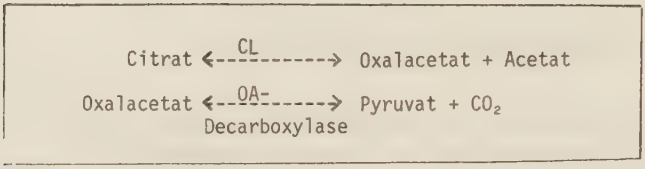
2.2 Messung der zu untersuchenden Parameter

2.2.1 Citrat

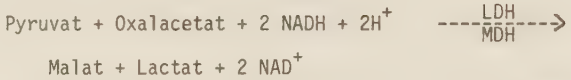
Zur Messung von Citrat kamen im wesentlichen zwei gängige Verfahren mit hoher Spezifität in Frage: Die UV- Spektrometrische Bestimmung (7) und die fluorimetrische Bestimmung (30). Wegen der einfachen Durchführbarkeit wurde hier das spektrometrische Verfahren nach MÖLLERING und GRUBER (25) vorgezogen. Es beruht auf folgendem Prinzip:

Im ersten Schritt der gekoppelten enzymatischen Reaktion katalysiert Citratlyase (CL) spezifisch die Umsetzung von Citrat zu Acetat und Oxalacetat (43). Andere Substanzen des Tricarbonsäurecyclus und verwandte Metaboliten werden von der CL nicht umgesetzt. Das aus Aerobacter aerogenes gewonnene Extrakt enthält neben CL jedoch auch Oxalacetat-Decarboxylase; dadurch wird das, aus Citrat durch Citratlyase gebildete Oxalacetat zu Pyruvat decarboxyliert (9), (6). Als Cofaktor für die Enzyme werden bivalente Zn^{2+} - Ionen hinzugesetzt (8).

Um sowohl Oxalacetat als auch Pyruvat vollständig zu erfassen, werden als Indikator-Enzyme sowohl Malat-Dehydrogenase (MDH) als auch Lactat-Dehydrogenase (LDH) hinzugesetzt. In der photometrischen Messung der Indikator-Reaktion wird die Abnahme der NADH-Konzentration als Extinktionsabnahme Δ E gemessen. Sie ist direkt proportional zu der angesetzten Citratmenge.



Indikatorreaktion:



Folgende Lösungen wurden verwendet:

I) $ZnCl_2$ / Triäthanolamin-Puffer (0,1 M Tra, pH = 7,6, 0,2 mM $ZnCl_2$)

II) Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (10 mM β-NADH) Firma BOEHRINGER

III) Lactat-Dehydrogenase/Malatdehydrogenase LDH/MDH (je 2mg Prot./ml) Firma BOEHRINGER

IV) Citratlyase (CL), (50- 100 U/l) Firma BOEHRINGER

V) Perchlorsäure (0,6 n) p.a.

VI) Kaliumlauge (2n) p.a.

Im Gegensatz zur CL-Stammsubstanz, die in zwei Monaten keinen meßbaren Aktivitätsverlust aufwieß, war bei der CL-Lösung bereits nach 24 h eine Aktivitätsminderung von etwa 10% nachweisbar. Da es sich bei der Citratmessung aber um eine Substanz-Konzentrationsmessung handelte, und die Aktivität der CL ausreichend war für eine vollständige Umsetzung des vorhandenen Citrats, hatte der Aktivitätsverlust innerhalb eines Tages keinen Einfluß auf das Ergebnis. Um einheitliche Inkubationszeiten zu erhalten, wurde sowohl die NADH-Lösung als auch die LDH/MDH- Lösung und die CL-Lösung für jeden Versuch neu angesetzt.

Praktische Durchführung:

a) Entproteinisierung

Zur Vermeidung einer eiweißabhängigen NADH-Umsetzung wurde zunächst mit Perchlorsäure entproteinisiert. Zu 1 ml Serum (bzw. Duodenalsaft) wurde 0,6 ml Perchlorsäure (V) hinzugegeben, homogenisiert und 10 min bei Raumtemperatur mit 4 000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge Rotixa/K, Firma Hettich)

b) Neutralisierung

1,0 ml aus dem klaren Oberstand wurden sodann zur Neutralisierung mit 0,1 m Kalilauge (VI) versetzt. Nach Homogenisierung und Zentrifugieren (5 min bei RT und 4 000 U/min), wobei sich das ausfallende Salz absetzte, wurden 0,4 ml aus dem klaren Oberstand als Probenlösung verwendet.
In eine Küvette mit 1 cm Schichtdicke wurden dann pipettiert

0,4 ml Probenlösung
\+ 2,0 ml Puffer (I)
\+ 0,1 ml NADH (II)

c) Gewinnung des Leerwertes von Pyruvat und Oxalacetat

Durch Zugabe von

0,02 ml LDH/MDH (III)

wurde dann die Reaktion zur Gewinnung des Leerwertes gestartet. Das in der Probe enthaltene Pyruvat und Oxalacetat wird dabei zu Lactat und Malat umgesetzt.
Zur Messung der Extinktionen wurde ein Spektralphotometer der Firma Eppendorf, Typ 1101, mit angeschlossenem Schreiber (Servogor S, Re 541, Metrawatt GmbH) herangezogen.
Nach Erreichen eines Plateaus (nach 3 min) wurde die konstante Extinktion E_o abgelesen.

d) Quantitative Umsetzung des Citrats

Durch Zugabe von

0,02 ml CL (IV)

wurde dann die eigentliche Meßreaktion gestartet, die nach etwa 10 min mit einer konstanten Extinktion E_1 beendet war. Die Extinktionsdifferenz $\triangle E = E_1 - E_0$ ging dann in die Berechnung ein.
Da jedoch auch bei Zugabe von CL zu destilliertem Wasser ein konstanter Extinktionsausschlag E_c ablesbar war, wurde geschlossen, daß die CL selbst Citrat enthielt.
Der Extinktionsanteil E_c, der auf das Citrat in der CL zurückzuführen war, wurde jeweils von der Gesamtextinktionsdifferenz $\triangle E$ subtrahiert.

e) Berechnung der Citratkonzentration

Zur Messung wurde Licht von der Wellenlänge 366 nm verwendet. Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt bei dieser Wellenlänge $\varepsilon = 3{,}3$ ($cm^2/\mu Mol$). Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm. Gemessen wurde bei 25° C (Raumtemperatur). Da im Serum wie auch im Duodenalsaft sehr geringe Konzentrationen von Citrat zu erwarten waren (11) wurde versucht, die Verdünnung der Probe im Bestimmungsansatz möglichst gering zu halten. Eine Limitierung ergab sich jedoch vor allem aus der Mindestmenge an Puffer, die zur Konstanthaltung des pH-Wertes während der Reaktion erforderlich war.
Die Enteiweißung von 1 ml Serum mit 0,6 ml Perchlorsäure und die anschließende Neutralisation von 1 ml Überstand mit 0,1 ml Kalilauge ergab die Verdünnungsfaktoren $f_1 = 1{,}6$ und $f_2 = 1{,}1$. Das Verhältnis von 0,4 ml Probe zu 2,54 ml Testlösung führte

zu einem Verdünnungsfaktor von $f_3 = 6{,}35$. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnete sich die Citrat-Konzentration wie folgt:

$$c_{Citrat} = \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \; f_1 f_2 f_3 \; (E_1 - E_2 - E_c) \left[\frac{\mu Mol}{cm^2 . cm} \right]$$

$$= \frac{1}{3{,}3 \cdot 1} \cdot 1{,}6 \cdot 1{,}1 \cdot 6{,}35 \cdot \Delta E \left[\frac{\mu Mol}{ml} \right]$$

$$= 3{,}39 \cdot 10^3 \cdot \Delta E \left[\frac{\mu Mol}{l} \right]$$

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei 366 nm
d = Schichtdicke der Küvette
$f_{1,2,3}$ = Verdünnungsfaktoren
ΔE = Extinktionsänderung

Die Messgenauigkeit war primär durch die Ablesegenauigkeit des an das Photometer angeschlossenen Schreibers auf 2µmol/ l begrenzt. Durch eine Standardverdünnungsreihe konnte eine lineare Beziehung zwischen Extinktionsdifferenzen und Citrat-Konzentration im Meßbereich von 2µmol/l bis 300µmol/l nachgewiesen werden.

2.2.2 HCO_3^-, Cl^-, und exokrine Enzyme

Sekretionsvolumen, Bicarbonat, Cl^- sowie die Enzymproteine Amylase, Lipase, Trypsin und Chymotrypsin werden im Sekretintest gemessen.
Bicarbonat wird titrimetrisch bestimmt, Amylase mit den Reagentien von PHADEBAS (PHARMACIA UPPSALA SCHWEDEN),

Lipase titrimetrisch durch pH- Stat-Titration mit Olivenöl/Gummi arabicum (3). Trypsin ließ sich durch die Reaktion mit N-Benzoyl- L- Argininäthylester (BAEE) photometrisch messen (3). Die Reaktion von Chymotrypsin mit N-Benzoyl - L- Thyrosinäthylester (BTEE) wird ebenfalls photometrisch gemessen.

2.3 Patientenkollektiv

2.3.1 Serumcitrat

Hier gliederte sich das Patientenkollektiv, das ausschließlich aus Krankenhauspatienten bestand, in drei Gruppen.

a) Normalpersonen

Sie hatten weder eine Anamnese noch klinische Zeichen, die auf eine Pankreatitis hinwießen. Laborchemisch lagen sie im Normalbereich. Bei ihnen war keine Alkoholanamnese zu erheben und die Leberwerte GPT, GOT und γ-GT unauffällig. Klinisch waren keine Zeichen einer alkoholischen Leberschädigung zu finden.
Entscheidend für die Zuordnung zur Gruppe der Normalpersonen waren die Ergebnisse des Sekretintestes. Gemessen wurden hier die Sekretionsparameter Volumen, HCO_3^-, Amylase, Lipase, Trypsin und Chymotrypsin bei Stimulierung des Pankreas durch i.v. Infusionen mit Sekretin und CCK. Die Werte mußten sämtlich im Normalbereich liegen.
Als weiteres Auswahlkriterium diente die Pankreaszielaufnahme. In ihr durften keine Verkalkungen nachweißbar sein.

b) Alkoholiker

Die Versuchspersonen in diesem Kollektiv hatten laut Anamnese seit mindestens 5 Jahren einen Alkoholkonsum von umgerechnet

mehr als 100 g reinen Alkohols pro Tag. Die Einweisung in die Klinik erfolgte wegen der Beschwerden, die auf den C_2H_5OH - Abusus zurückzuführen waren.

c) Patienten mit chronisch calcifizierender Pankreatitis (CCP)

Aus den Eingangsanamnesen war zu entnehmen, daß folgende Symptome zur Einweisung in die Klinik geführt hatten:

- Oberbauchschmerzen unbekannter Genese
- Gewichtsverlust
- Meteorismus
- rezidivierende acholische Fettstühle
- Durchfall
- Fettunverträglichkeit

Im Gegensatz zum Kollektiv der Normalpersonen wiesen die Sekretionswerte der Pankreasfunktionsparameter im Sekretintest eine Abweichung von den Normalwerten im Sinne einer exokrinen Pankreasinsuffizienz auf. Auch Serum-Amylase und Serum-Lipase gaben Hinweise auf eine gestörte Pankreasfunktion.

Ausschlaggebend für die Zuordnung zur Gruppe der CCP-Patienten waren röntgenologisch nachweisbare Verkalkungen im Bereich des Pankreas.

2.3.2 Citrat im Sekretin-Test

Es wurden zwei Kollektive erstellt:

a) Normalpersonen
b) Patienten mit CCP

Dabei erfolgte Zuteilung zu den Kollektiven in gleicher Weise wie beim Serumcitrat beschrieben.

2.3.3 Dosis-Wirkungskurven unter Cerulein-Stimulation

Zur Dosis-Wirkungsmessung von Citrat, Amylase, Lipase, Trypsin und Chymotrypsin wurden nur Normalpersonen zugelassen.

2.4 Testverfahren

Zur Signifikanzanalyse wurde der t-Test herangezogen, der verteilungsunabhängig ist. Bei der Korrelation der Sekretionsmengen von Proteinen und Citrat im Dosis-Wirkungs-Versuch wurden Mittelwerte herangezogen.

k_m und v_{max} für Citrat, Lipase und Trypsin wurden direkt aus den Dosis-Wirkungskurven entnommen.

3 Ergebnisse

Die Meßergebnisse gliedern sich in drei Gruppen

1) Citrat im Serum
2) Citrat in Leber- und Blasengalle
3) Citrat im Duodenalsaft

3.1 Citratkonzentration im Serum (Abb. 2)

a) Normalpersonen

Bei den Männern fand sich eine mittlere Serumkonzentration von 123,3 ± 7,9 µmol/l, bei Frauen 128,1 ± 4,5 µmol/l.

b) Alkoholiker

Die Männer hatten durchschnittliche Serumkonzentrationen von 120,2 ± 5,4 µmol/l und die Frauen 125,9 ± 9,7 µmol/l Citrat.

c) CCP-Patienten

Sie waren alle männlich, ihre Serumcitratkonzentration lag im Mittel bei 111,8 ± 11,2 µmol/l.
Die Serumcitratkonzentrationen von Alkoholikern und CCP- Patienten waren nicht signifikant niedriger als die von Normalpersonen.

3.2 Citratkonzentration in der Galle (Abb. 3)

Zur Beurteilung des Citratgehaltes im Duodenalsaft war die getrennte Messung von Lebergalle und Blasengalle erforderlich.
Die aus dem T- Drain postoperativ (nach Cholecystektomie) gewonnene Lebergalle (n=7) ergab eine mittlere Citratkonzentration von 30,4 ± 2,3 µmol/l.
Mit 19,4 ± 2,8 µmol/l lag die in reiner Blasengalle (n=7) gemessene Citratkonzentration signifikant ($p < 0{,}005$) niedriger als die reiner Lebergalle.

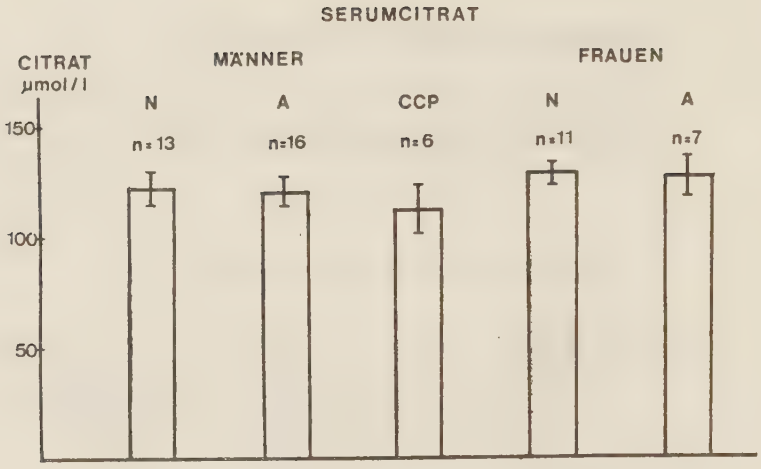


Abb. 2: Serumcitrat - Konzentration
(N = Normalpersonen, A = chronische Alkoholiker,
CCP = Patienten mit chron. calcif. Pankreatitis)

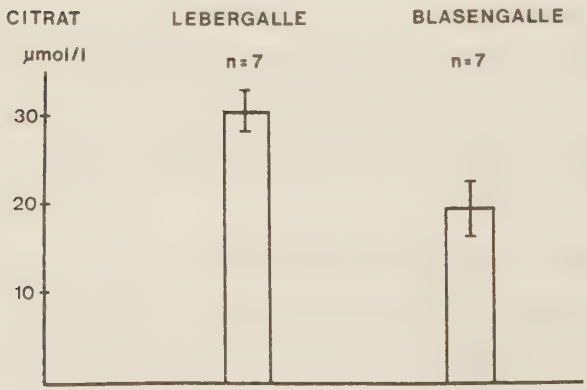


Abb. 3: Citrat - Konzentration in Lebergalle und Blasengalle

3.3 Meßergebnisse im Duodenalsaft

Im Duodenalsaft wurden Volumen, Citrat, exokrine Enzymproteine, Bicarbonat und Chlorid gemessen. Die Sekretionsmengen wurden als $\frac{\text{Vol x Konz.}}{\text{20 Min x kg KG}}$ berechnet.

3.3.1 Sekretintest

3.3.1.1 Volumensekretion (Abb. 4)

Sowohl Normalpersonen als auch CCP- Patienten zeigten von Fraktion 1 bis Fraktion 3 steil ansteigende Sekretionsvolumina. In allen drei Fraktionen waren die Sekretionsvolumina von CCP- Patienten gegenüber denen von Normalpersonen signifikant ($p < 0{,}05$) erniedrigt.

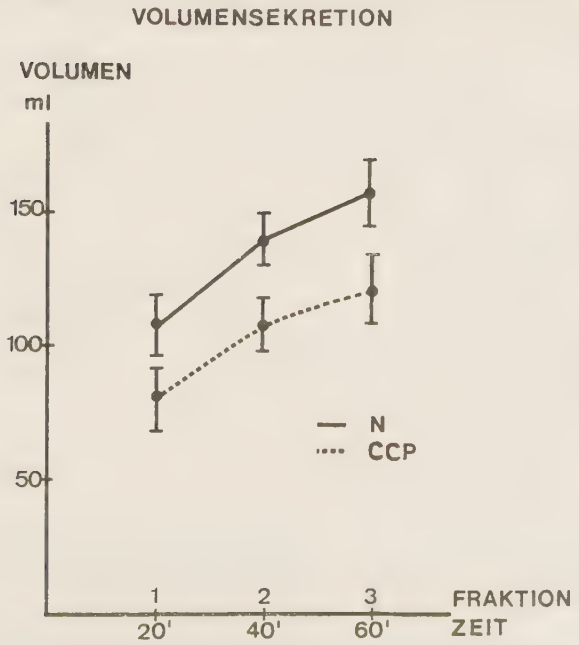


Abb. 4: Volumensekretion bei Normalpersonen (N) und Patienten mit chronisch calcifizierender Pankreatitis (CCP)

3.3.1.2 Bicarbonat- und Chloridsekretion (Abb. 5)

Während die HCO^-_3 - Konzentrationen und Sekretionsmengen von CCP - Patienten in allen drei Fraktionen gegenüber denen bei Normalpersonen signifikant ($p < 0,001$), erniedrigt waren, war bei Cl^- umgekehrt eine signifikante ($p < 0,001$) Erhöhung der Konzentrationen feststellbar.
Bezüglich der Konzentrationen wiesen Bicarbonat und Chlorid ein spiegelbildliches Sekretionsverhalten auf.

Im CCP-Kollektiv war die Cl^- - Konzentration in der zweiten Fraktion am höchsten, während die HCO_3^- - Konzentration hier einen gegenüber den anderen Fraktionen erniedrigten Wert aufwies.
Die HCO_3^- - Sekretionsmenge zeigte im Normalkollektiv von der 1. zur 3. Fraktion einen steileren und signifikant ($p<0,001$) höheren Anstieg als im CCP- Kollektiv.

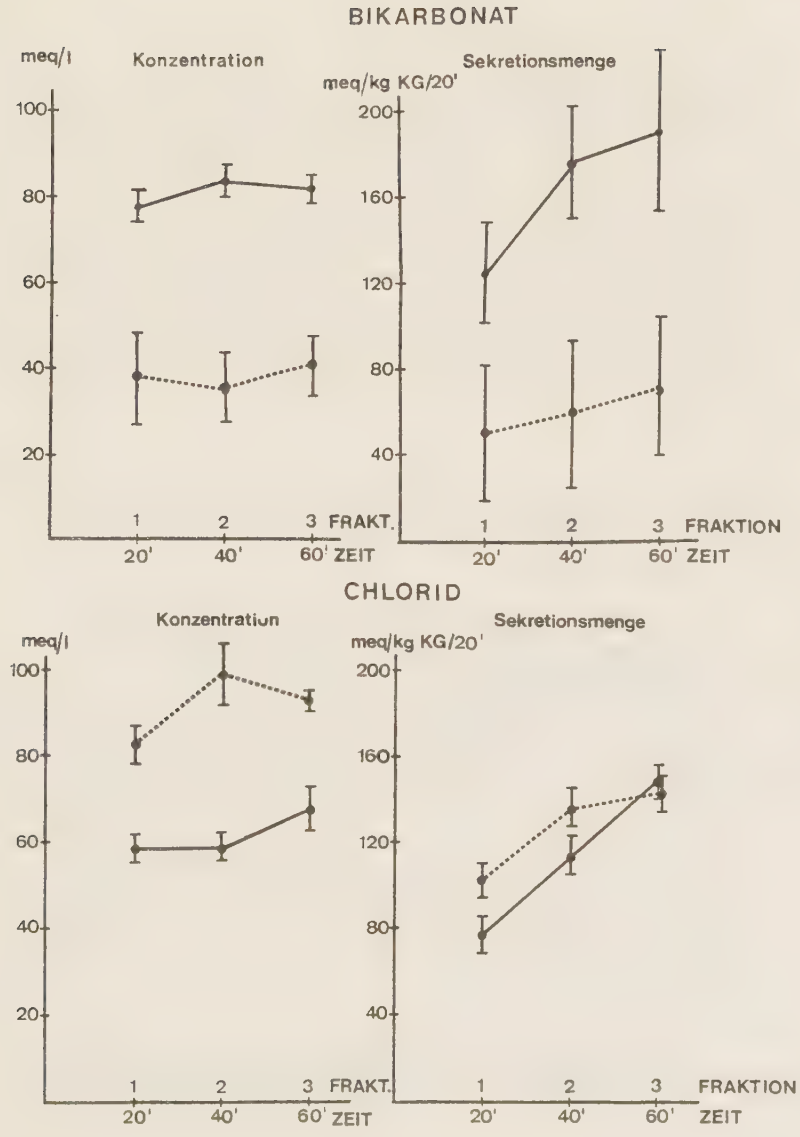


Abb. 5: Konzentration und Sekretionsmenge von Bicarbonat und Chlorid im Sekretintest

3.3.1.3 Proteinsekretion (Abb. 6, 7)

Gegenüber den Normalpersonen waren bei den CCP- Patienten Konzentration und Sekretionsmenge der vier Verdauungsenzyme Amylase, Lipase, Trypsin und Chymotrypsin in allen drei Fraktionen hoch signifikant ($p < 0,0005$) vermindert.
Im Kollektiv der Normalpersonen zeigte die Sekretion von Amylase, Lipase und Chymotrypsin einen deutlich steileren Anstieg (von der ersten zur dritten Fraktion) als bei CCP-Patienten. In der 3. Fraktion war die Protein-Sekretionsmenge im Normalkollektiv mindestens 7-fach höher als im CCP- Patientenkollektiv.

3.3.1.4 Citrat-Sekretion (Abb. 8, 9)

a) Citrat-Konzentration

In allen drei Fraktionen war die Citrat- Konzentration im Duodenalsaft von CCP- Patienten gegenüber der von Normalpersonen hoch signifikant ($p < 0,001$) erniedrigt.
Bei Normalpersonen stieg die Konzentration von 23,1 $\pm$ 1,7 µmol/l Citrat in der 1. Fraktion auf 32,2 $\pm$ 2,81 µmol/l in der 2. Fraktion an und fiel in der 3. Fraktion wieder auf einen Wert von 28,7 $\pm$ 1,84 µmol/l ab.
Dagegen zeigten CCP- Patienten einen stetigen Anstieg der Konzentrationen von 8,5 $\pm$ 1,92 µmol/l Citrat in der 1. Fraktion über 10,3 $\pm$ 2,63 µmol/l in der 2. Fraktion bis zu 12,1 $\pm$ 3,12 µmol/l in der 3. Fraktion.

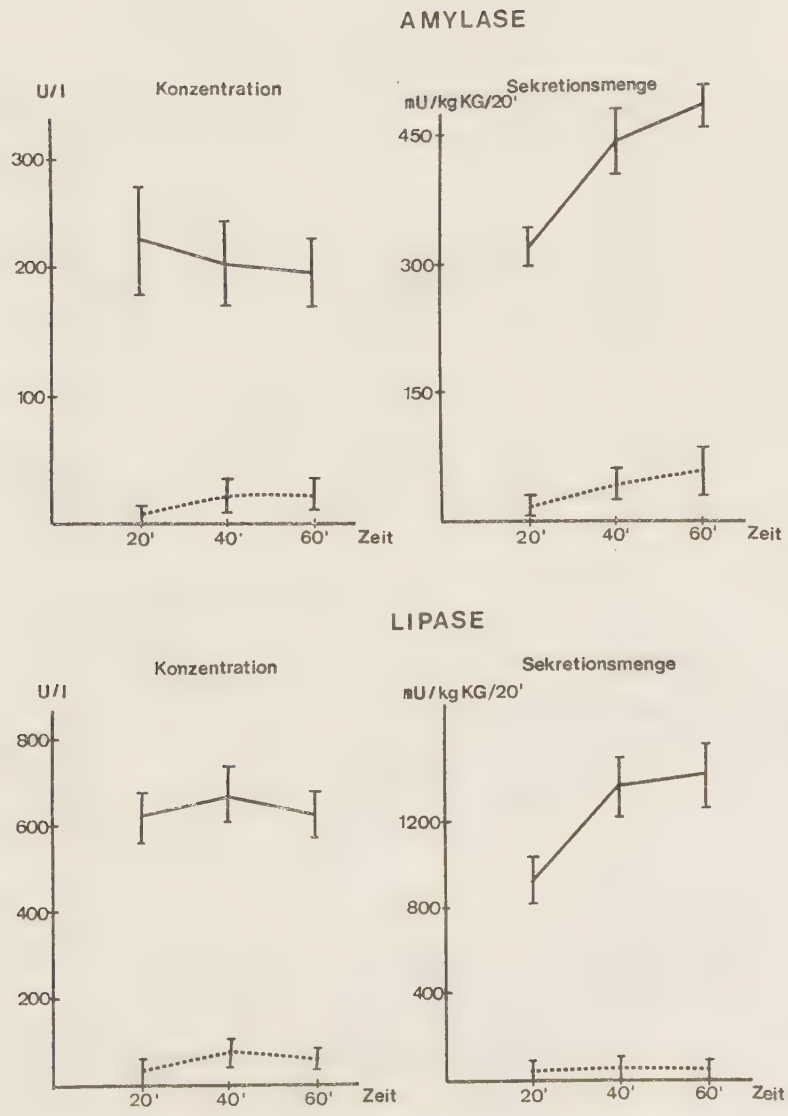


Abb. 6 : Konzentration und Sekretionsmenge von Amylase und Lipase im Sekretintest

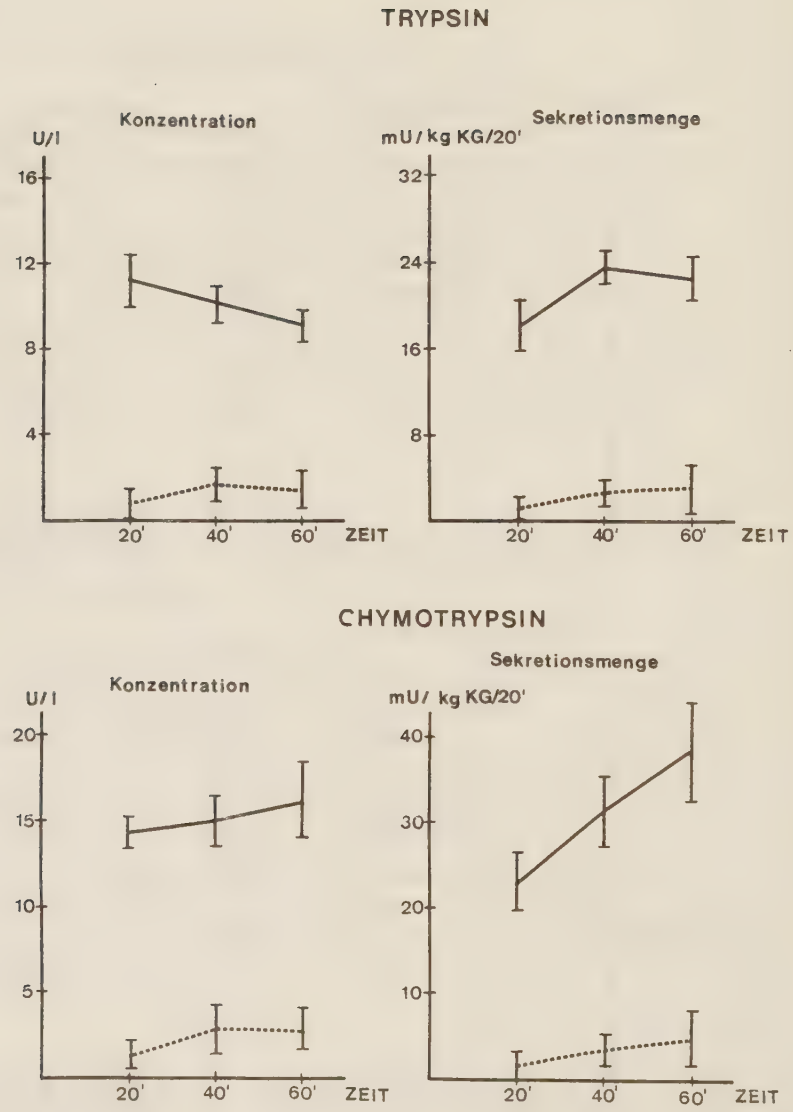


Abb. 7 : Konzentration und Sekretionsmenge von Trypsin und Chymotrypsin im Sekretintest

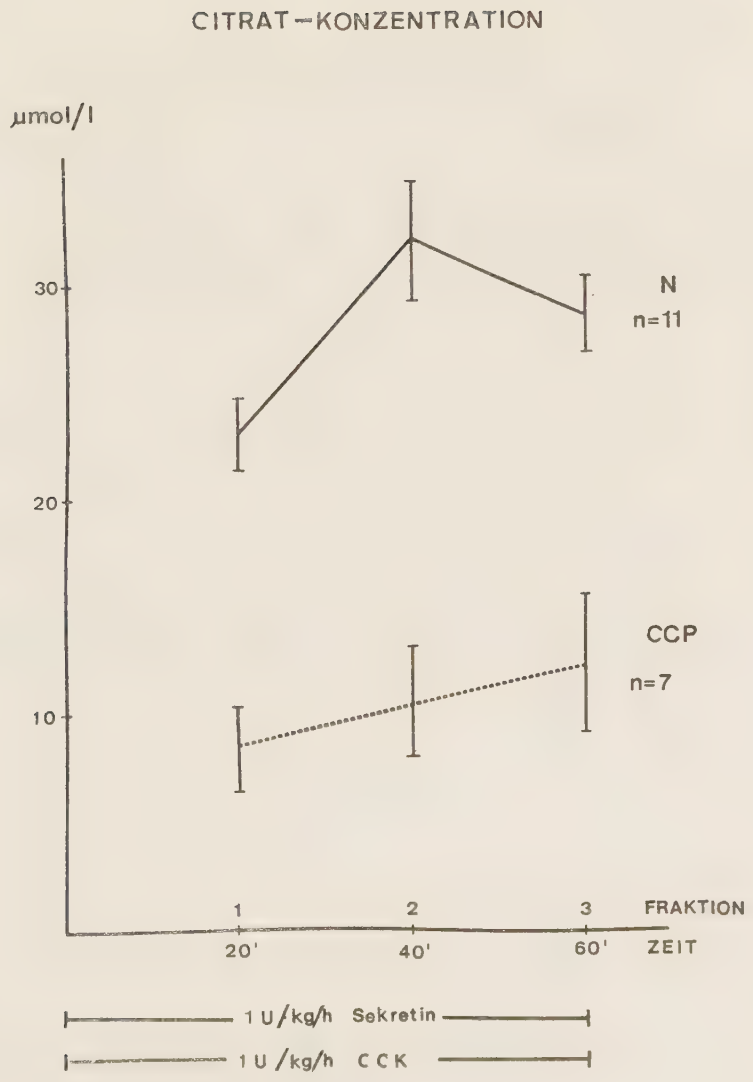


Abb. 8 : Citrat-Konzentration im Sekretintest bei Normalpersonen und CCP-Patienten

b) Citrat- Sekretionsmenge

Auch die Sekretionsmengen waren in den drei Fraktionen bei CCP-Patienten signifikant niedriger ($p < 0{,}001$) als bei Normalpersonen.

I) Normalpersonen: Bei ihnen stieg die Menge von 36,2 ± 4,4 nmol/kgKG/20' um 83 % auf 66,5 ± 7,2 nmol/kgKG/20' in der 2. Fraktion an. In der 3. Fraktion war die Sekretion mit 65,4 ± 4,1 nmol/kgKG/20' etwas geringer (2 %).

II) CCP-Patienten: Hier war ein stetiger Anstieg der Sekretion von 10,1 ± 2,7 nmol/kgKG/20' in der 1. Fraktion auf 16,3 ± 4,0 nmol/kgKG/20' in der 2. Fraktion und 21,6 ± 5,6 nmol/kgKG/20' in der 3. Fraktion zu verzeichnen. Die Sekretionsmenge in der 3. Fraktion war 110 % höher als die in der 1. Fraktion. Die Sekretionsmenge im CCP-Kollektiv erreichte in der ersten Fraktion 28 %, in der zweiten 24 % und in der dritten 33 % des Wertes vom Normalkollektiv. Selbst die höchste Sekretionsmenge (in der dritten Fraktion) betrug nur 60 % der niedrigsten Sekretionsmenge im Normalkollektiv (Fraktion 1).

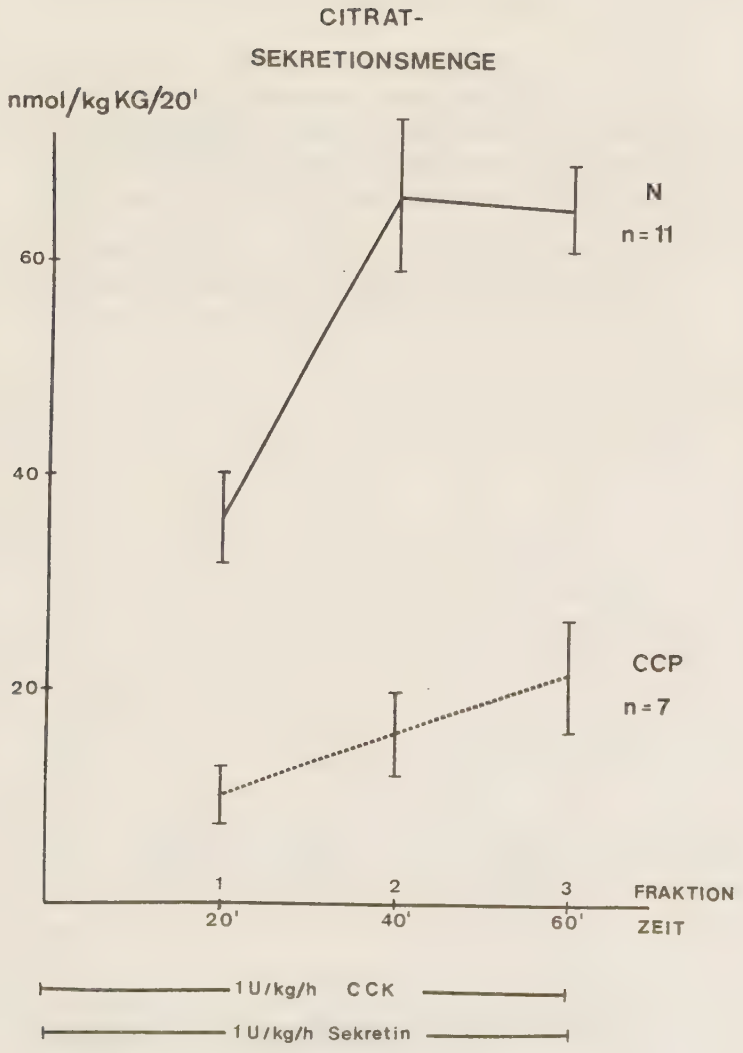


Abb. 9 : Citrat- Sekretionsmenge im Sekretintest bei Normalpersonen und CCP- Patienten

3.3.1.5 Korrelation der Sekretionsmengen von Citrat und Enzymproteinen (Abb. 10, 11)

Für die Korrelation zwischen Citratsekretion und Proteinsekretion wurde eine Regressions-Gerade zugrunde gelegt. Nur im CCP- Kollektiv waren Korrelationen nachzuweisen, deren Koeffizienten größer als 0,6 waren. Die höchste Korrelation ergab sich in der Gegenüberstellung von Citrat und Lipase.

Bei Korrelation der Konzentrationen von Citrat und Lipase ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,75$, bei Korrelation der Sekretionsmengen von Citrat und Lipase von $r = 0,73$.

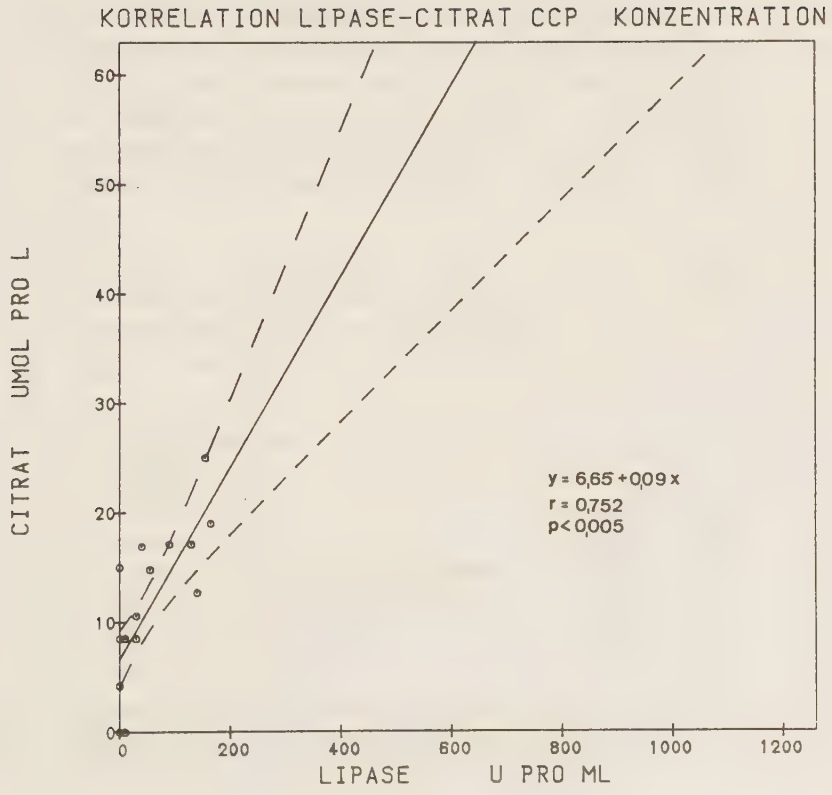


Abb. 10 : Korrelation der Konzentrationen von Lipase und Citrat im Sekretintest (CCP- Patienten-Kollektiv)

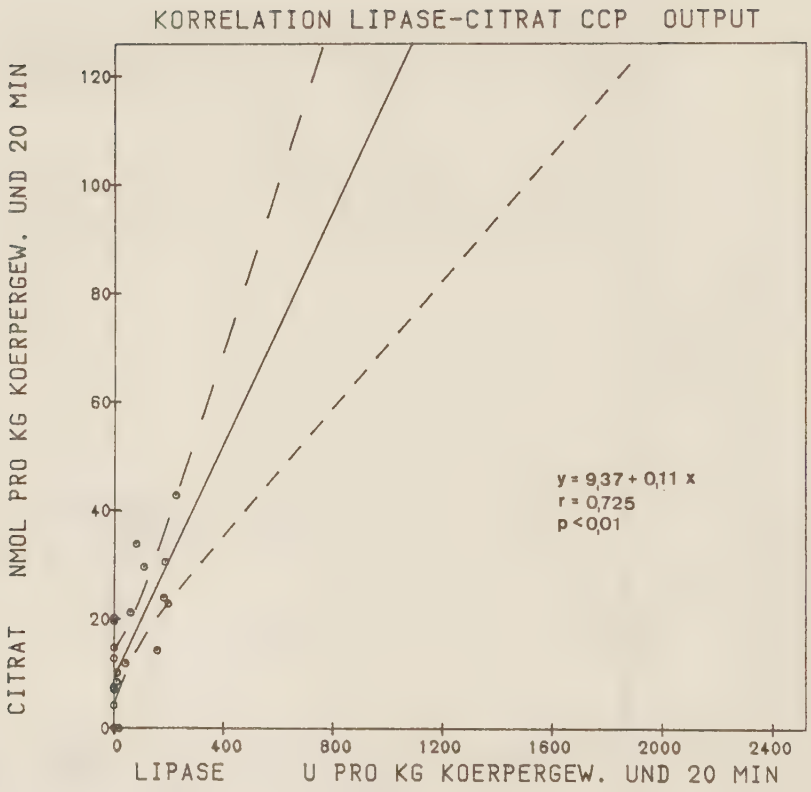


Abb. 11 : Korrelation der Sekretionsmengen (Output) von Lipase und Citrat im Sekretintest (CCP- Patienten-Kollektiv)

3.3.2 Dosis- Wirkungsbeziehungen bei Cerulein-Stimulation

3.3.2.1 Sekretionsmuster von Citrat (Abb. 12, 13)

a) Citrat-Konzentration:

Nach einem initialen Abfall von 29,5 ± 1,7 µmol/l in der 1. Fraktion auf 12,8 ± 1,9 µmol/l in der 2. Fraktion ("washing - out"- Phänomen), war ein stetiger Anstieg bis zum Maximum von 26,5 ± 2,2 µmol/l in der 11. Fraktion zu verzeichnen. Danach fiel die Konzentration trotz weiterer Stimulation mit steigenden Dosen Cerulein wieder ab.

b) Citrat-Sekretionsmenge:

Die minimale Sekretion betrug 3,3 ± 0,7 nmol/kg / 5' in der 3. Fraktion und stieg bis zur höchsten Sekretionsrate von 12,9 ± 1,2 nmol/kg / 5' in Fraktion 11 an.

3.3.2.2 Sekretionsmuster von Bicarbonat und Enzym-Proteinen (Abb. 14, 15, 16, 17, 18)

Die Bicarbonatsekretion zeigte einen steilen initialen Anstieg und zunehmende Abflachung. Die höchste Sekretion war in Fraktion 13 mit 54,0 ± 1,32 [µeq/kg /5 min] erreicht. Amylase und Lipase hatten die maximale Sekretionsmenge in Fraktion 13. Dagegen war die maximale Sekretionsmenge von Trypsin bereits in Fraktion 11 erreicht und fiel bis zu Fraktion 15 wieder ab.
Die Chymotrypsin-Sekretionsmenge stieg bis zur Fraktion 15 an.

3.3.2.3 Korrelation Citrat-Bicarbonat, Citrat-Proteine

Die Korrelation von Citratsekretion und Bicarbonatsekretion ergab einen Korrelationskoeffizienten von r= 0,78. Von den Enzymproteinen korrelierte die Trypsinsekretion am besten mit der Citratsekretion (r= 0,95). Die Korrelation der Sekretionsmengen von Lipase und Citrat ergab einen Korrelationskoeffizienten von r= 0,94, von Chymotrypsin und Citrat r= 0,91, von Amylase und Citrat r= 0,79.

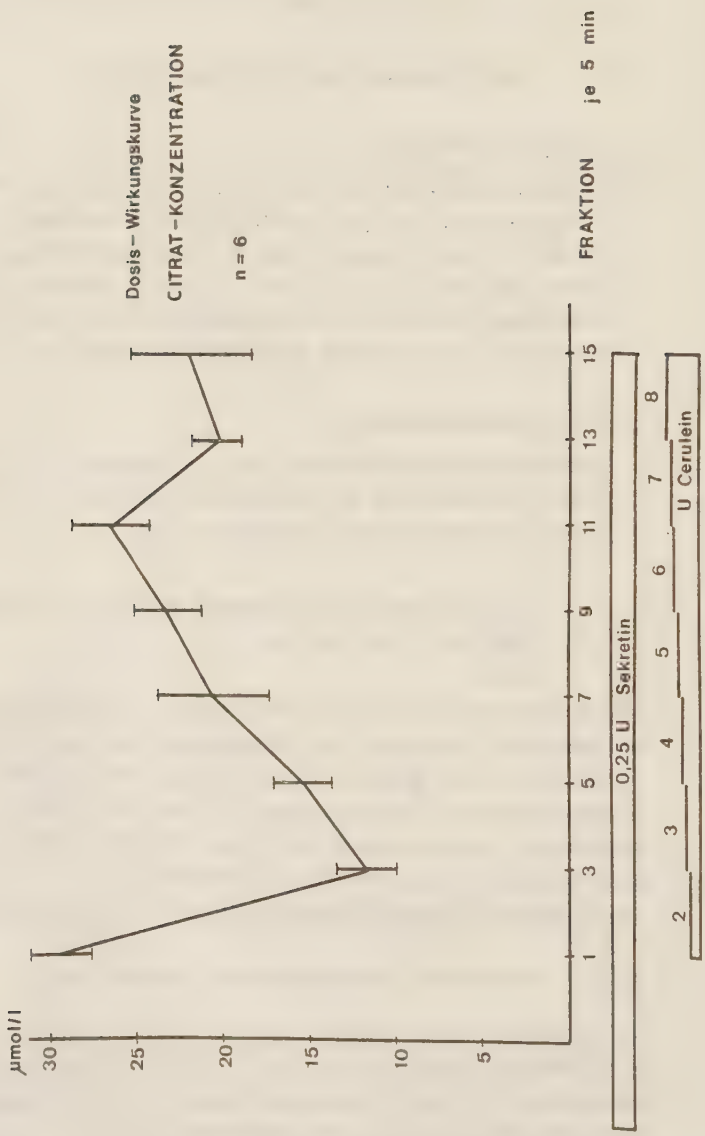


Abb. 12 : Dosis-Wirkungskurve der Citrat-Konzentration bei Stimulation mit steigenden Dosen Cerulein

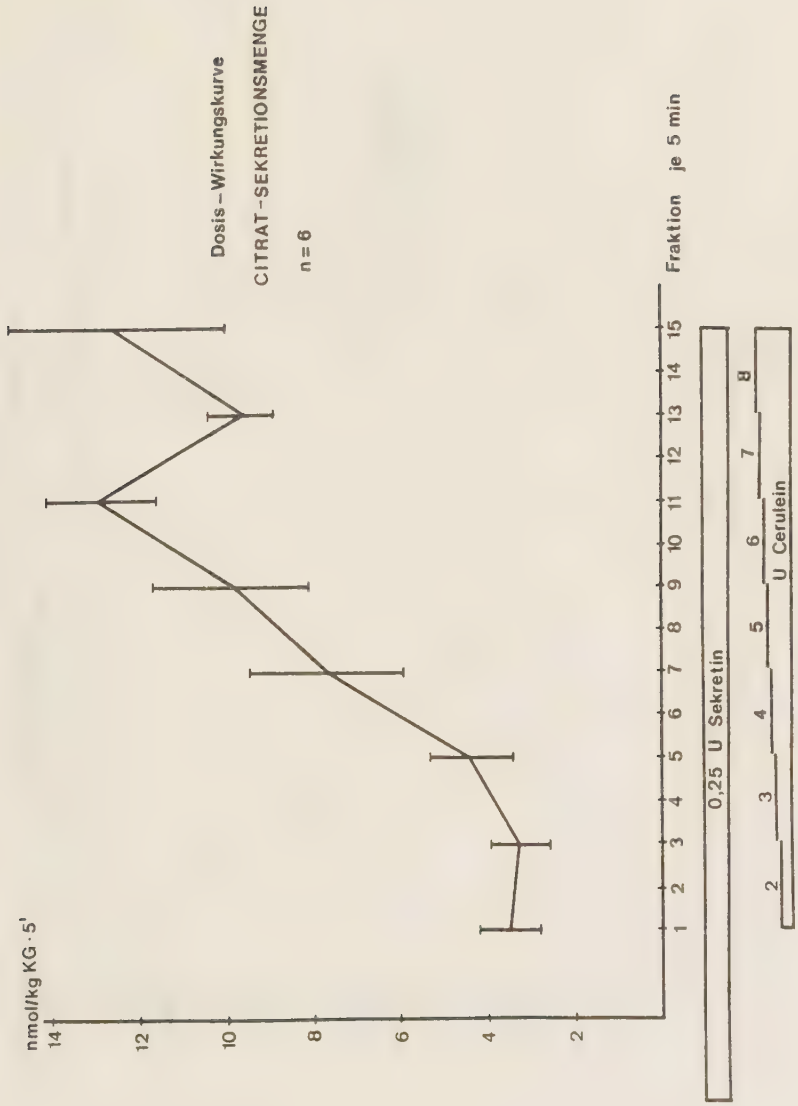


Abb. 13 : Dosis-Wirkungskurve der Citrat-Sekretionsmenge bei Stimulation mit steigenden Dosen Cerulein

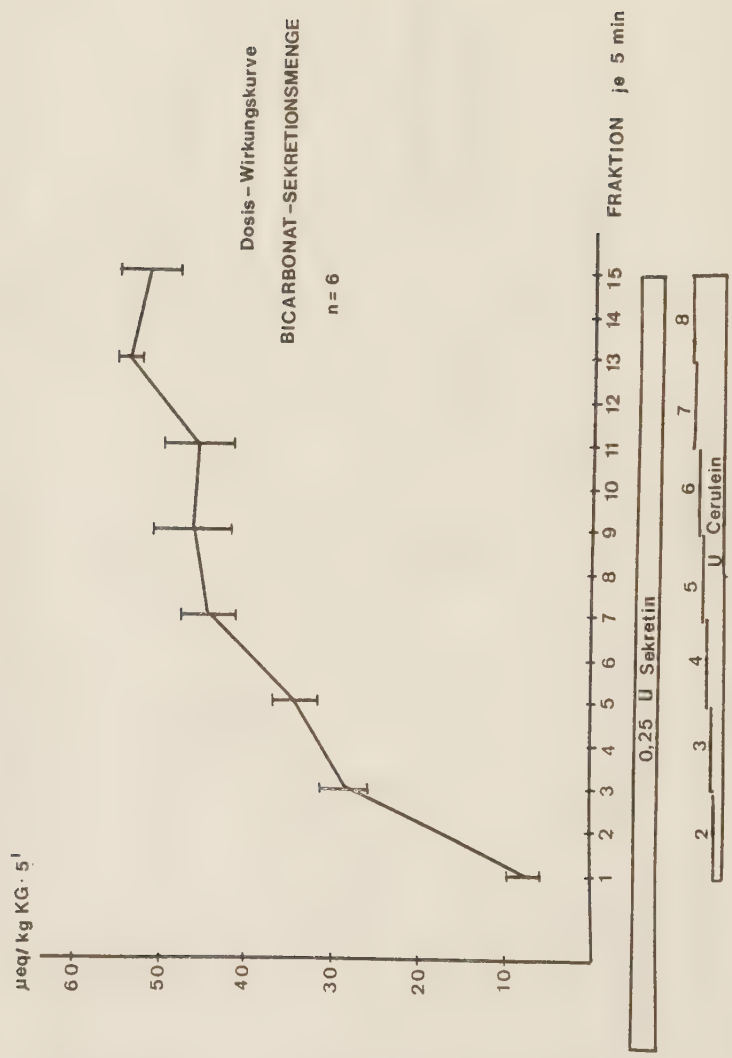


Abb. 14 : Dosis-Wirkungskurve der Bicarbonat-Sekretionsmenge bei Stimulation mit steigenden Dosen Cerulein

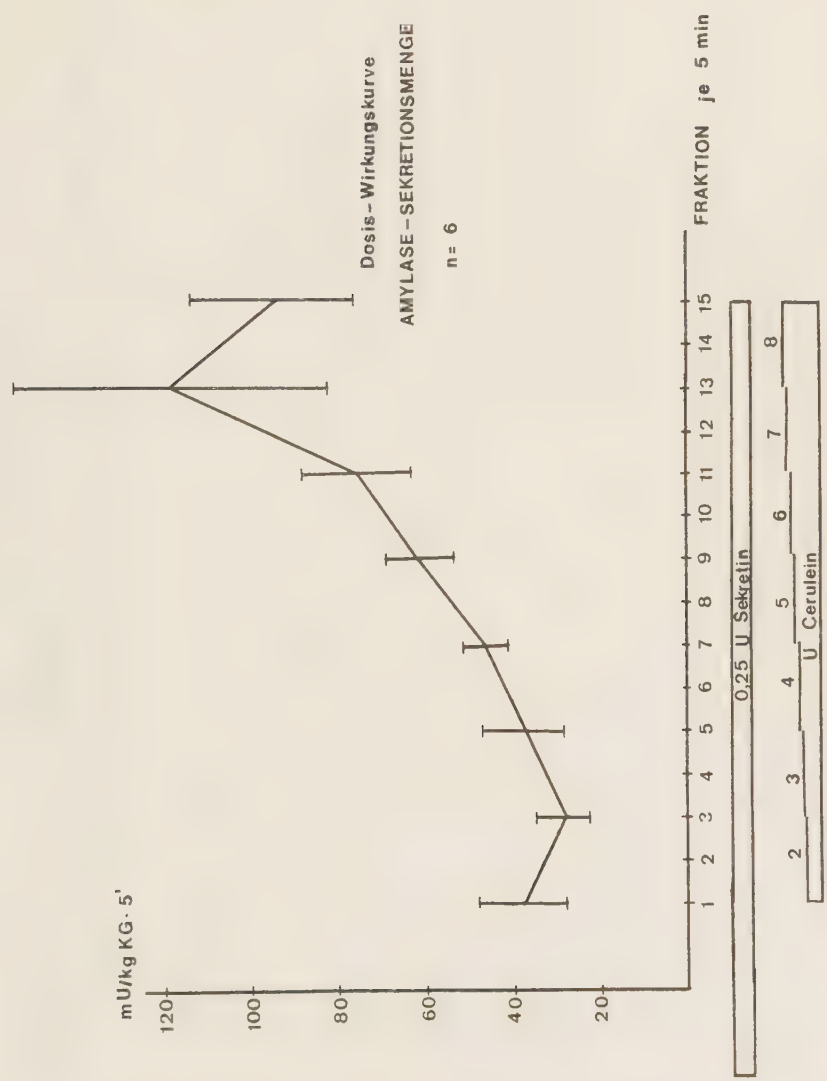


Abb. 15 : Dosis-Wirkungskurve der Amylase-Sekretionsmenge bei Stimulation mit steigenden Dosen Cerulein

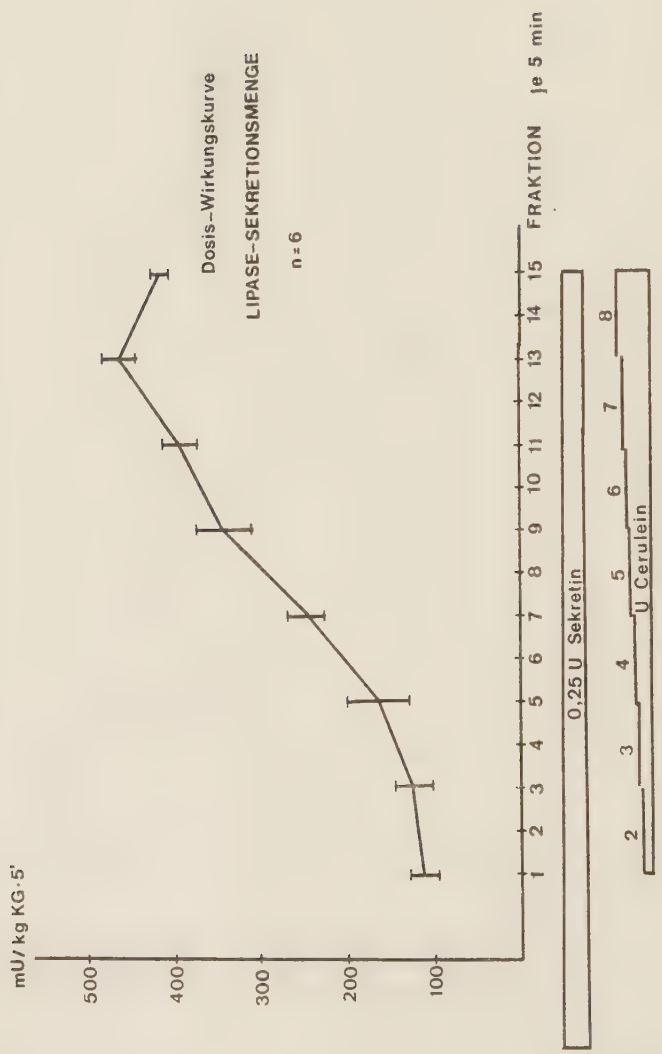


Abb. 16 : Dosis-Wirkungskurve der Lipase-Sekretionsmenge bei Stimulation mit steigenden Dosen Cerulein

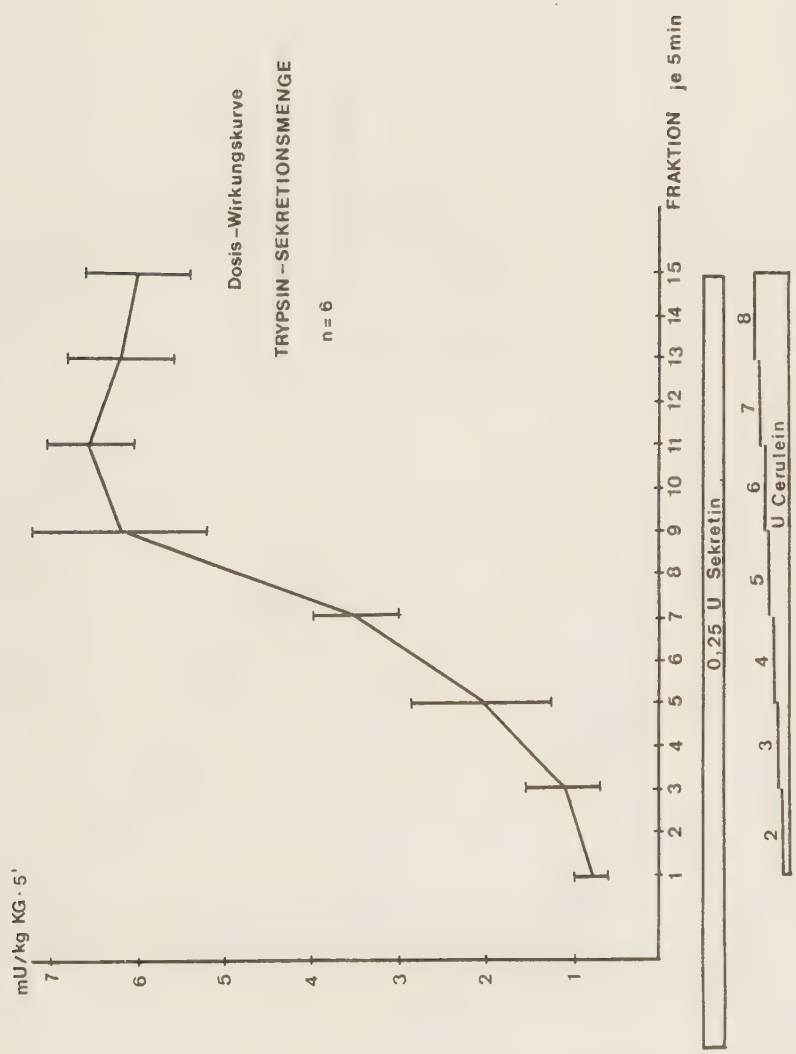


Abb. 17 : Dosis-Wirkungskurve der Trypsin-Sekretionsmenge bei Stimulation mit steigenden Dosen Cerulein

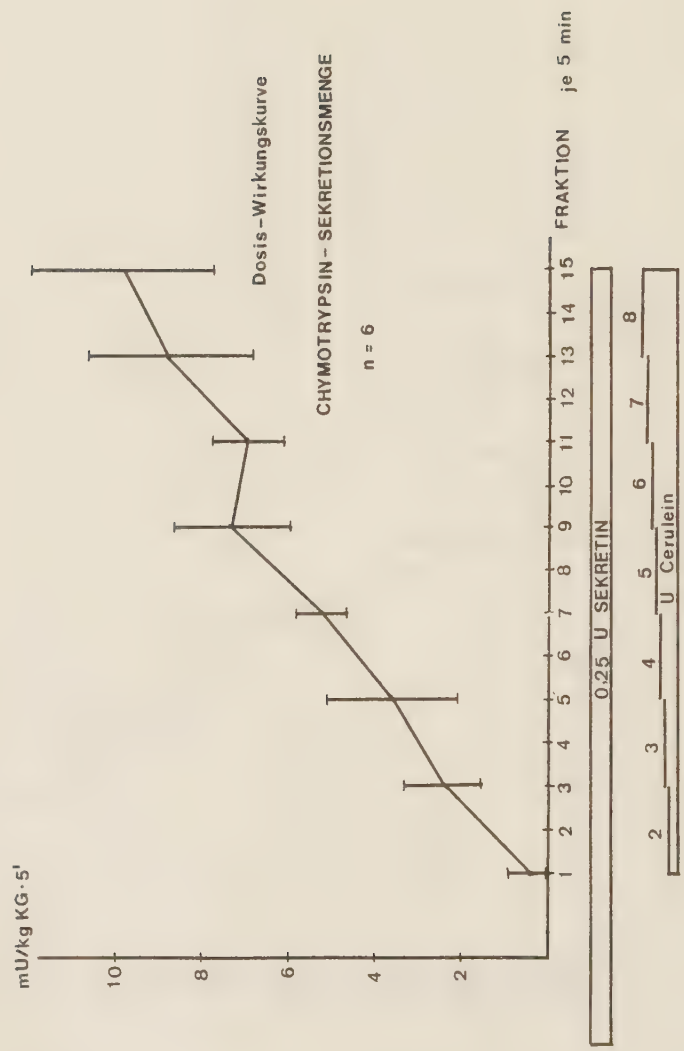


Abb. 18 : Dosis-Wirkungskurve der Chymotrypsin-Sekretionsmenge bei Stimulation mit steigenden Dosen Cerulein

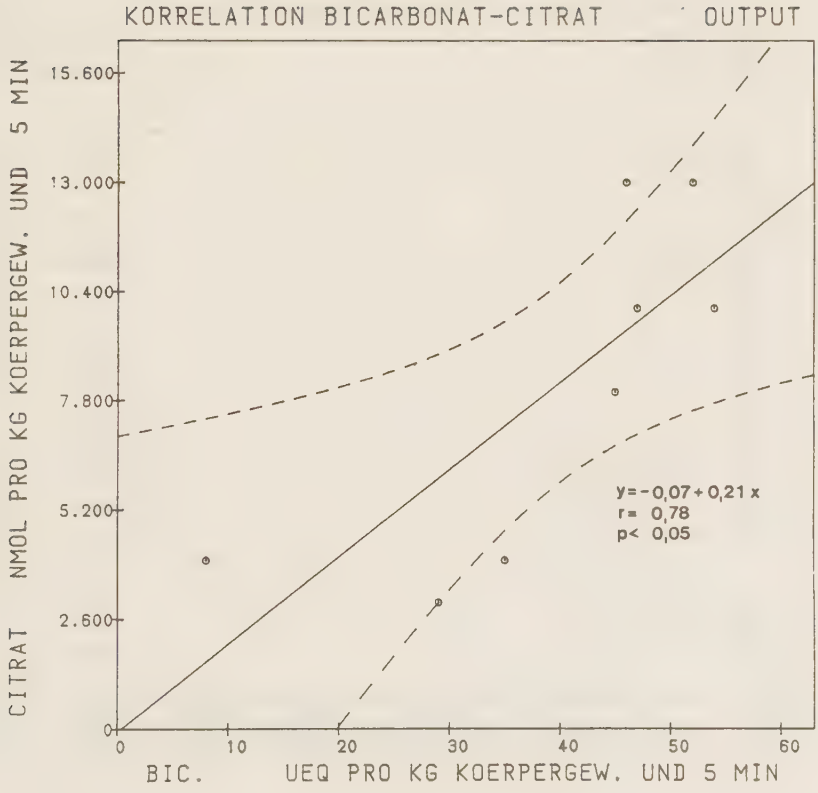


Abb. 19 : Korrelation der Sekretionsmengen von Bicarbonat und Citrat im Dosis-Wirkungs-Versuch

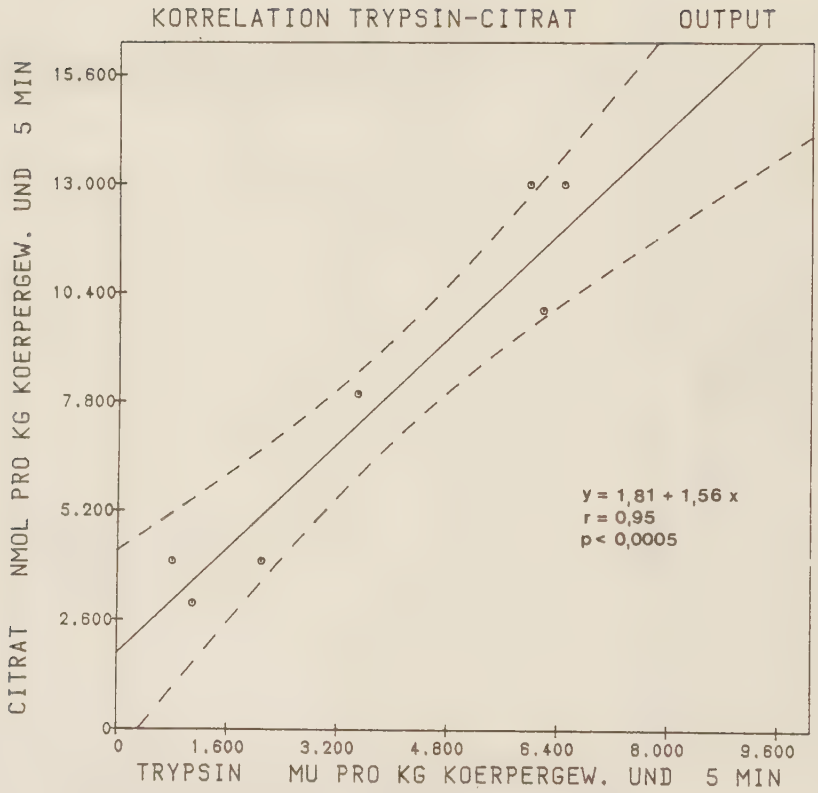


Abb. 20 : Korrelation der Sekretionsmengen von Trypsin und Citrat im Dosis-Wirkungs-Versuch

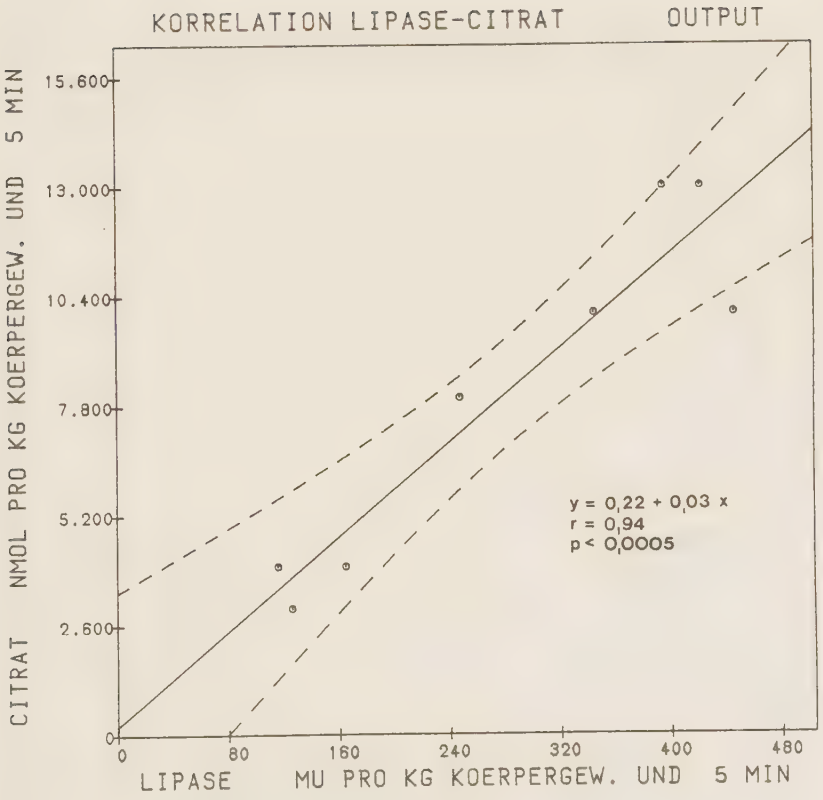


Abb. 21 : Korrelation der Sekretionsmengen von Lipase und Citrat im Dosis-Wirkungs-Versuch

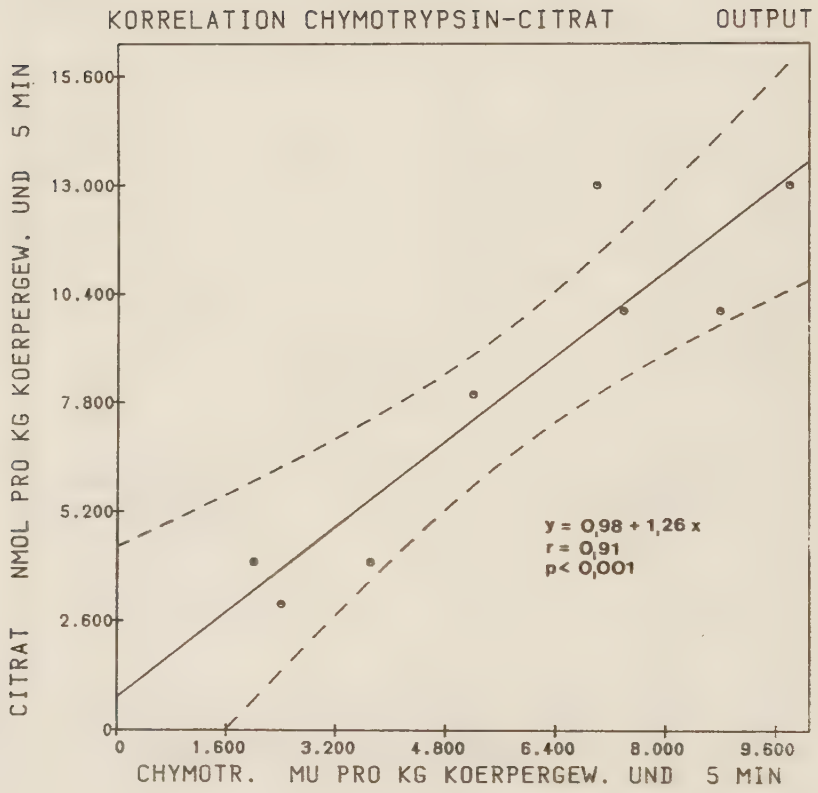


Abb. 22 : Korrelation der Sekretionsmengen von Chymotrypsin und Citrat im Dosis-Wirkungs-Versuch

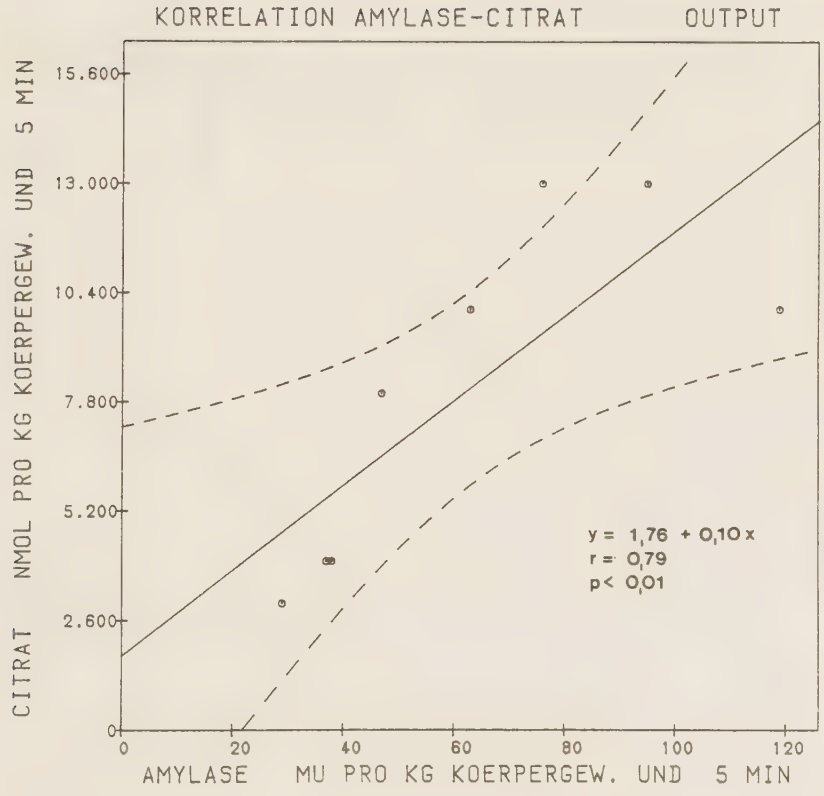


Abb. 23 : Korrelation der Sekretionsmengen von Amylase und Citrat im Dosis-Wirkungs-Versuch

3.3.2.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung von Citrat, Lipase und Trypsin

Aus den Dosis-Wirkungskurven von Citrat, Lipase und Trypsin (Abb. 13,16,17) ließen sich die maximal erreichbaren Sekretionsraten entnehmen. Sie lagen bei v_m = 465 mU/kg/5' für Lipase und v_m = 6,55 mU/kg/5' für Trypsin sowie v_m = 12,9 nmol/kg/5' für Citrat. Die Stimulationsdosis, mit der eine halbmaximale Sekretion erreicht wurde, betrug jeweils 4 U Cerulein.

Die doppelt reziproke Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Citrat, Lipase und Trypsin nach LINEWEAVER-BURK ergab die in Abb. 24,25,26 dargestellten Regressionsgeraden.

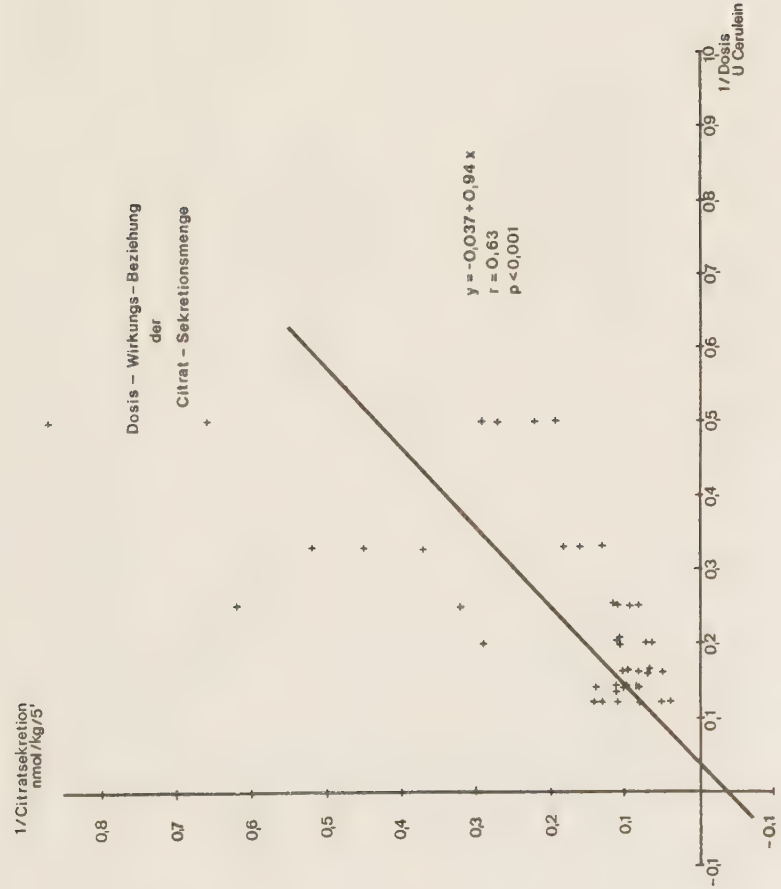


Abb. 24 :Dosis-Wirkungs-Beziehung der Citratsekretion

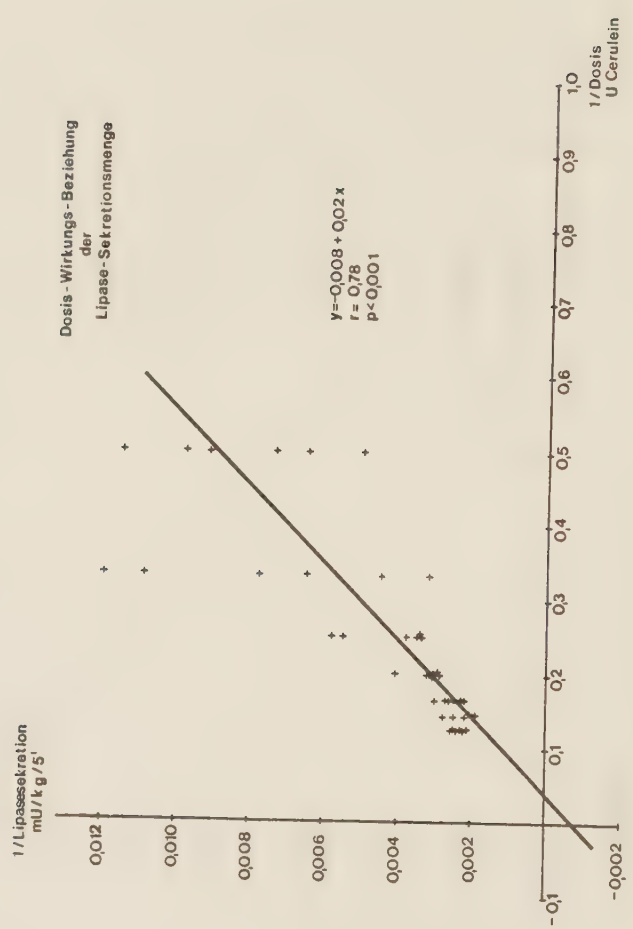


Abb. 25: Dosis-Wirkungs-Beziehung der Lipasesekretion

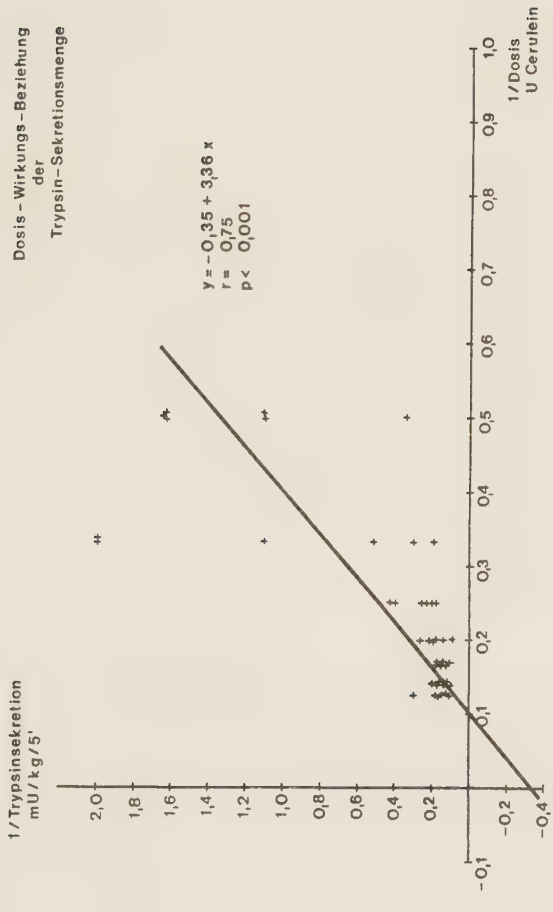


Abb. 26: Dosis-Wirkungs-Beziehung der Trypsinsekretion

4 DISKUSSION

Bei Patienten mit chronisch calcifizierender Pankreatitis besteht gegenüber Normalpersonen eine ausgeprägte exokrine Insuffizienz hinsichtlich der Volumen- und Enzymsekretion; hingegen verhält sich die Chlorid- der Bicarbonatsekretion umgekehrt proportional. Diese Befunde stellen bereits bekannte Phänomene der Erkrankung dar und sollen deshalb hier nicht eingehend diskutiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die am normalen Hund (23) und am Menschen (Lohse et al., unveröffentlicht) gewonnenen Befunde einer CCK-stimulierbaren Citratsekretion aus dem Pankreas. Wie beim Hund wird Citrat auch beim Menschen zusammen mit den Enzymproteinen aus den Azinuszellen ausgeschieden, worauf sowohl die signifikanten Korrelationen zwischen Enzymproteinen und Citrat als auch die gleichen k_m-Werte im Dosis-Wirkungs-Versuch hinweisen. Im Sekretin-CCK-Test waren diese Korrelationen nicht nachweisbar - mit Ausnahme von Lipase/Citrat bei CCP-Patienten-, vermutlich auf Grund der großen Streubreite der Einzelwerte bei 20-minütiger Fraktionierung; hingegen bestand bei 5-minütiger Fraktionierung im Dosis-Wirkungs-Versuch zwischen allen gemessenen Enzymproteinen und Citrat eine deutlich signifikante Korrelation.

Die Citratkonzentration im Duodenalsaft setzt sich aus dem hepatischen (Leber- und Blasengalle) sowie aus dem pankreatischen Anteil zusammen. Sie beträgt bei Normalpersonen etwa 25 % der Serumkonzentration; vergleichbare Konzentrationen werden in der Lebergalle gefunden, während in der Blasengalle die Citratkonzentrationen noch niedriger liegen, vermutlich auf Grund resorptiver Vorgäng, wie sie auch für kleinmolekulare Substanzen und Elektrolyte bekannt ist. Die im Vergleich zum Serum erniedrigten Werte in Leber- und Blasengalle werden erklärt durch die in der Leber vorhandene Citratlyase, die Citrat zu CO_2 und H_2O metabolisiert. Nach Perfusion von verschiedenen Tierlebern mit konzentrierten Citratlösungen fand SJÖSTRÖM (34) nach einmaliger hepatischer Passage eine signifikante Reduktion der Citratkonzentration.

Für die Beurteilung des pankreatischen Anteils im Duodenalsaft gelten die in Leber- und Blasengalle gemessenen Werte als Orientierung der hepatischen Citratsekretion. Im reinen Pankreassekret liegen die

Citratkonzentrationen nach i.v. Bolusinjektion (3 U/kg KG) bei etwa 63 umol/l, entsprechend 50 % der Serumkonzentration (Lohse et al. unveröffentlicht) und damit um 100 % höher als in der Lebergalle, d.h. die im Duodenalsaft gemessenen Citratkonzentrationen sind vorwiegend durch den pankreatischen Anteil determiniert. Die niedrigeren Werte im Duodenalsaft sind durch die gleichzeitige Sekretin-Infusion erklärbar, in deren Gefolge ein Verdünnungseffekt durch die vermehrte Wassersekretion eintritt.

Im Vergleich zu gesunden Normalpersonen wird bei Patienten mit chronisch calcifizierender Pankreatitis auf dem Boden eines chronischen Alkoholabusus sowohl die Citratkonzentration als auch die Sekretionsmenge im Duodenalsaft signifikant vermindert gefunden. Diese Einschränkung beträgt im Duodenalsaft etwa 66 %; die Sekretion von Enzymproteinen ist um etwa 86 % erniedrigt, d.h. die Citratsekretion nimmt bei Patienten mit calcifizierender Pankreatitis - unter Berücksichtigung der Tatsache, daß im Duodenalsaft gemessen wurde (s.o.) und unter der Annahme, daß die hepatische Citratsekretion nicht beeinträchtigt ist - in ähnlichem Maße wie die Proteinsekretion ab. Vergleichbare Beobachtungen wurden an chronisch alkoholischen Hunden gemacht, die nach steigenden Dosen i.v. exogen zugeführten Ceruleins signifikant weniger Citrat im reinen Pankreassekret aufwiesen als normale Kontrolltiere (22).

Die reduzierte Citratsekretion im Duodenalsaft von Patienten mit chronisch calcifizierender Pankreatitis kann nicht Folge eines verminderten Serum-Citratspiegels sein, wie die vorliegenden Messungen des Serum-Citrats ergeben haben. Sowohl bei Normalpersonen und chronischen Alkoholikern als auch bei Patienten mit chronisch calcifizierender Pankreatitis fanden sich keine signifikant unterschiedlichen Serum-Citratkonzentrationen. Eine alkoholinduzierte Einschränkung der Leberfunktion würde eher zu erhöhten posthepatitischen Citratspiegeln führen (34).

Es ist anzunehmen, daß die reduzierte Citratsekretion Ausdruck der metabolischen und sekretorischen Funktionseinschränkung des exokrinen Pankreas ist; diese Annahme wird gestützt durch den Nachweis signifikant

erniedrigter Lactat-Konzentrationen bei der gleichen Patientengruppe (unveröffentlichte Daten) im Duodenalsaft.

Citrat ist in der Lage, mit freien Calcium-Ionen stabile, lösliche Chelatkomplexe einzugehen, bedingt durch die hohe Affinitätskonstante (pK=3.15). Entsprechend der Formel von Calciumcitrat ($Ca_3 (C_6H_5O_7)_2$) binden 2 µmole Citrat 3 µmole ionisierten Calciums. Nach anderen Untersuchungen (20), (21) beträgt die Konzentration von Ca^{++} im Duodenalsaft von Normalpersonen etwa 360 µmol/l. Bei den im Duodenalsaft von Normalpersonen gemessenen Citratkonzentrationen von im Mittel 30 µmol/l wäre eine Bindung von etwa 45 µmol Calcium, entsprechend 12,5 % des gesamten freien Calciums anzunehmen. Bei Patienten mit calcifizierender Pankreatitis würden demnach nur noch etwa 4 % komplex gebunden. Da jedoch die Citratkonzentrationen im reinen Pankreassekret bei etwa 63 µmol/l liegen, entsprechend einer Bindung von etwa 95 µmol Calcium, ist im reinen Pankreassekret mit einer Komplexbildung von etwa 26 - 27 % des vorhandenen freien Calciums zu rechnen. Bei Patienten mit calcifizierender Pankreatitis ist durch die Reduktion der Citratkonzentration um 66 % nur noch mit einer Bindung von 8 - 9 % der vorhandenen Calcium-Ionen zu rechnen.

Hieraus läßt sich ableiten, daß die reduzierte pankreatische Citratsekretion bei chronisch alkoholischer Pankreatitis als ein Teilfaktor erhöhter ionisierter Calciumkonzentrationen im Duodenalsaft anzusehen ist. Diese erhöhten Calciumkonzentrationen könnten dann die Präzipitation schwerlöslichen $CaCO_3$, wie es bei calcifizierender Pankreatitis beobachtet wird, begünstigen und die Entstehung von Pankreassteinen mitverursachen. Da außerdem bekannt ist, daß die Protein-Niederschläge, die möglicherweise die organische Matrix der Pankreassteine darstellen, durch Inkubation mit Citrat über 3 - 5 Tage wieder aufgelöst werden können (10), wäre es möglich, daß die reduzierte Citratkonzentration die Entstehung dieser Proteinpräzipitate mitverursacht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die duodenale Citrat-Sekretion von CCP-Patienten gegenüber Normalpersonen signifikant vermindert ist. Dies kann nicht auf einen erniedrigten Serumcitrat-Spiegel zurückzuführen sein, da dieser bei Normalpersonen, Alkoholikern und CCP- Patienten keine signifikanten Unterschiede zeigte.

Die Korrelation der Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei Cerulein-Stimulation des exokrinen Pankreas von gesunden Normalpersonen ergab eine lineare Beziehung zwischen Citrat und den Enzymproteinen Amylase, Lipase, Trypsin sowie Chymotrypsin. Daraus wird auf einen ähnlichen Sekretionsmechanismus enzymatischer Proteine und Citrat geschlossen.

Da Citrat bei CCP- Patienten prozentual etwa im gleichen Maße vermindert ausgeschieden wird wie die exokrinen Enzym-Proteine, hat sich bei Patienten mit chronisch calcifizierender Pankreatitis parallel zur Protein-Sekretionsinsuffizienz offenbar eine Citrat-Sekretionsinsuffizienz des exokrinen Pankreas entwickelt; sie muß als ein weiterer Faktor, der zur Entstehung von Pankreas-Calcifikationen beitragen kann, diskutiert werden.

Gelänge es, die pankreatogene Citrat-Sekretion durch orale bzw. parenterale Citrat-Gabe zu erhöhen, dann wäre eine therapeutische Litholyse von Pankreassteinen in vivo möglich.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Allan, J., White, T.T.: An alternate mechanism for the formation of protein plugs in chronic calcifying pancreatitis. Digestion 11 (1974) 428.

2) Baltaxe, H.A., Leslie, E.V.: Vanishing pancreatic calcifications. A case report. Am. J. Roentgen 99 (1967) 642

3) Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Band II. Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1974

4) Colomb, E., Pianetta, C., Estevenon, J.P., Guy, O., Figarella, C., Sarles, H.: Lactoferrin in human pancreas. Digestion 14 (1976) 242-249

5) Creutzfeldt, W.: Kininliberierung bei Pankreatitis. In: Neue Aspekte der Trasyloltherapie, hrsg. von G. L. Haberland, P. Matis. Schattauer, Stuttgart 1969

6) Dagley, S.: Citrate. UV-spectrometric analysis. In: Bergmeyer, H.U. Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York, 1. Aufl. 1965, 313-316

7) Dagley, S.: Citrat. UV-Spectrometrische Bestimmung. In: Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Band II. Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1974

8) Dagley, S., Dawes, E.A.: Citridesmolase: Its properties and mode of action. Biochem. biophys. Acta 17 (1955) 177

9) Dagley, S., Dawes, E.A.: Measurement of citrate metabolizated by extract of aerobacter aerogenes. Enzymologia 16 (1953) 226

10) De Caro, A., Lohse, J., Sarles, H.: Characterisation of a protein isolatet from pancreatic calculi of men suffering from chronic calcifying pancreatitis. Biochem. biophys. Res. Comm., Vol. 87, No. 4 (1979) 1176-1182

11) Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen. 7. Auflage, Basel 1969

12) Edmonson H.A., Bullock, W.K., Mehl, J.W.: Chronic pancreatitis and lithiasis. I. A clinopathological study of 62 cases of chronic pancreatitis. Am. J. Pathol. 25 (1949) 1127

13) Edmonson H.A., Bullock, W.K., Mehl, J.W.: Chronic Pancreatitis and lithiasis. II. Pathology and pathogenesis of pancreatic lithiasis. Am. J. Pathol. 37 (1950) 37-55

14) Figarella, C., Estevenon, J.P., Sarles, H.: Measurement of lactoferrin in pancreatic juice. Lancet 8073 (1978) 1105-1106

15) Gedigk, P.: Pankreas. In Eder, M., Gedigk, P., (Hrsg.): Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie. 29. Auflage, S. 548-554, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1975

16) Gullo, L., Sarles, H., Mott, C., Tiscorna, O., Pastor, J., Pauli, A.M.: Pancreatic secretion of calcium in the normal and in various diseases of the pancreas. Rendic. Gastroenterol. 6 (1974) 35

17) Hekman, A.M.: Association of lactoferrin with other proteins, as demonstrated by changes in electrophoretic mobility. Biochim. Biophys. Acta 251 (1971) 380-387

18) Kassel, B., Kay, J.: Zymogens of proteolytic enzymes. These enzymes precursors formerly thought to be inert substances have inherend proteolytic activity. Science 180 (1973) 1022

19) Lohse, J., Charbit, J., Sahel, J., Verine, H., Schmidt, D., Sarles, H.: Citrate secretion in pancreatic juice. Gastroenterology 74 (1978) 1057

20) Lohse, J., Hümmer, H., Pfeiffer, A., Kuntzen, O., Kaess, H.: Ionized calcium and citrate secretion in the duodenal juice of normals and patients with chronic calcifying pancreatitis. European pancreatic club. 12th meeting Copenhagen Denmark. 11-13 October 1979

21) Lohse, J., Pfeiffer, A., Kaess H.: Ionized calcium secretion in the duodenal juice of normals, chronic alcoholics and patients with different stages of chronic alcoholic pancreatitis. In: Progress in enzyme and ion-selective electrodes. Edit. by: Lübbers,D.W., Acker, H., Buck, R.P., Eisenman, G., Kessler, M., Simon, W.. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1981, 231-235

22) Lohse, J., Schmidt, D., Charbit, J., Sarles, H.: Pancreatic citrate and protein secretion of normal and alcoholic dogs. Vorgelegt bei: Europ. J. Phys.

23) Lohse, J., Verine, H.J., Charbit, J.J., Sarles, H.: Studies on pancreatic stones. II. Citrate secretion in the canine pancreatic juice. Digestion 21 (1981) 198-204

24) Lohse, J., Verine, H.J., Sarles, H.: Studies on pancreatic stones. I. In vitro dissolution. Digestion 21 (1981) 125-132

25) Möllering, H., Gruber, W.; Tetermination of citrate with citrate lyase. Anal. Biochem. 17 (1966) 369

26) Moore, E.W., Verine, H.J.: The physical chemistry of pancreatic calcification and stone formation. II. The equilibrium formation constants of the soluble calcium complexes $CaCO_3$ and $CaHCO_3^+$. Gastroenterology 68 (1975) 960

27) Moore, E.W., Verine, H.J.: The physical chemistry of pancreatic calcification and stone formation. III. A thermodynamic model for the physicochemical state of calcium in pancreatic juice. Gastroenterology 68 (1975) 959

28) Owens, J.L., Howard, J.M.: Pancreatic calcification: A late sequel in the natural history of chronic alcoholism and alcoholic pancreatitis. Ann. Surg. 147 (1958) 326-338

29) Paris, J., Fourlinnie, J.C., Gerard, A., Lescut, J., Paris, J.C., Linquette, M.: Les troubles de la glycoregulation au cour des pancreatites chroniques. Arch. franc. Mal. Apper. dig. 57 (1967) 65

30) Passonneau, J.V., Brown, J.G.: Citrat. Fluorimetrische Bestimmung. In: Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Band II. Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1974

31) Payan, H., Sarles, H., Demirdjian, M., Gauthier, A.P., Cros, R.C., Durbec, J.P.: Study of the histological features of chronic pancreatitis by correspondence analysis. Identification of chronic calcifying pancreatitis as an entity. Rev. europ. Et. Clin. Biol. 17 (1972) 663-692

32) Perinet, G., Verine, H., Lafont, R., Haladjian, J.: Etude thermique des calculs pancreatiques humains et bovines. C.R. Acad. Sci. Paris 274, serie D (1972) 3303

33) Rösch, J.: Roentgenologic diagnosis of pancreatic disease. Amer. J. Roentgenol. 100 (1976) 664

34) Sjöström, P.: Der Citratgehalt im Blutserum als Diagnostikum bei Krankheiten der Leber und Gallenwege. Chir. Scandin. Acta, 79, Suppl. 49 (1937) 189-228

35) Sali, A., Crowe, C., Iser, J., Donohue, W., Kune, O.A.: Bilary citrate secretion. Aust. N. Z. J. Med. 10 (1980) 107-116

36) Sarles, H.: Alcoholism and pancreatitis. Scand. J. Gastroent. 6 (1971) 193

37) Sarles, H.: Chronic calcifying pancreatitis. Chronic alcohol pancreatitis. Gastroenterology 66 (1974) 604

38) Sarles, H.: Pancreatitis. Symposium of Marseille. April 25-26, 1963. Krager, Basel 1963

39) Sarles, H., Cros, R.C., Nicolas, R., Durbec, J.P.: Quantity of alcohol consumation and risk of chronic pancreatitis. Scand. J. Gastroent. 11 (Suppl.) (1976) 41

40) Sarles, H., Singer, M.: Akute und chronische Pankreatitis, Verlag Gerhard Witzstrock, Baden-Baden - Köln - New York 1978

41) Sarles, H., Singer, J.: Die chronische Pankreatitis. In M. Forell (Hrsg.): Handbuch der Inneren Medizin. Bd. III Teil 6., S. 737, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1976

42) Sarles, H., Tiscornia, O., Palasciano, G.: Chronic alcoholism and canine exocrine pancreas secretion. A long term follow-up study. Gastroenterology 72 (1977) 238-243

43) Tate, S.s., Datta, S.P.: The equilibrium of the reaction catalysed by citrate oxaloacetate-lyase. Biochem. J. 94 (1965) 470-477

44) Tucker, D.H., Moore, I.B.: Vanishing pancreatic calcifications in chronic pancreatitis. A sign of pancreatic carcinoma. New Engl. J. Med. 268 (1963) 31.

45) Verine, H.J.: An animal model for a human disease: bovine pancreatolithiasis. Comp. Pathol. Bull., Washington 5 No. 3 (1973) 183

46) Verine, H.J., Moore, E.W.: The physical chemistry of pancreatic calcification and stone formation. I. The solubility product (K_{sp}) of $CaCO_3$. Clin. Res. 23 (1975) 396

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Chefarzt Prof. Dr. H. Kaess für die Überlassung des Themas und für seine Hilfe bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit.

Weiter danke ich Herrn Oberarzt Dr.Kuntzen und Herrn Dr. Lohse für ihre Anleitung und ihren Rat sowie Frl. Fänger, ohne deren Hilfe die Messungen nicht hätten durchgeführt werden können.

Für die sorgfältige Niederschrift des Manuskripts bedanke ich mich bei Frau Stippler und für die allgegenwärtige Hilfe bei meiner Frau Christl.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 23. März 1951 als Sohn des Oberstudiendirektors Eugen Hümmer und seiner Frau Jutta, geb. Seyler, in Neuendettelsau, Kreis Ansbach, geboren. Die ersten fünf Jahre lebte ich mit meinen Eltern in Ansbach, bis wir 1955 nach Lindau übersiedelten. Von 1957 bis 1961 besuchte ich dort die Grundschule; anschließend besuchte ich neun Jahre lang den naturwissenschaftlichen Zweig der Oberrealschule Lindau, die ich 1970 mit dem Abitur abschloß.

Im Oktober 1970 begann ich das Studium des Bauingenieurwesens an der Technischen Universität München und schloß es 1975 mit dem Diplom ab. Im Wintersemester 1975/76 wurde ich zum Medizinstudium zugelassen, bestand im März 1977 das Physikum und ein Jahr später das erste Staatsexamen. Nach dem zweiten Staatsexamen im März 1980 begann ich das "Praktische Jahr". Im ersten Trimester war ich in der Chirurgie im Krh. München-Harlaching, im zweiten Trimester in der Haunerschen Kinderklinik und im dritten Trimester, das ich am 7. Februar 1981 abgeschlossen habe, in der zweiten medizinischen Abteilung des Krh. München-Schwabing.
Mit dem schriftlichen Teil des 3. Staatsexamens am 7.April und dem mündlichen Teil am 1. Juni habe ich das Medizinstudium abgeschlossen.